

**Die Signalvermittlung der Rezeptor-Tyrosinkinase Ror2
in mesenchymalen Bindegewebszellen**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

Dissertation

von Andreas Winkel

aus Goslar

1. Referent: PD Dr. Gerhard Gross
2. Referentin: PD Dr. Susanne Illenberger
eingereicht am: 16.12.2004
mündliche Prüfung (Disputation) am: 10.03.2005
(Druckjahr 2005)

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	7
1.1	DER KNOCHEN	7
1.1.1	Endochondrale Ossifikation.....	7
1.1.2	Intramembranöse Ossifikation.....	9
1.1.3	Fehlbildungen.....	9
1.2	ROR2.....	10
1.2.1	Expressionsmuster	10
1.2.2	Struktur.....	11
1.2.3	Brachydaktylie Typ B und Robinow-Syndrom.....	12
1.2.4	Verwandschaftsgrade (Konservierung im Tierreich).....	13
1.3	VERBINDUNG MIT SIGNALWEGEN.....	15
1.3.1	TGF- β -Superfamilie	15
1.3.2	MAP-Kinase-Signalwege.....	16
1.3.2.1	MAP-Kinasen.....	17
1.3.2.2	MAP-Kinase-Kinasen (MAPKK)	18
1.3.2.3	MAP-Kinase-Kinase-Kinasen (MAPKKK)	18
1.3.2.4	TAK1 (TGF- β -aktivierte Kinase 1)	19
1.3.3	Wnt-Signalwege (wnt = wingless-related).....	20
1.4	FRAGESTELLUNG.....	22
2	MATERIAL UND METHODEN	23
2.1	ALLGEMEINE METHODEN IM UMGANG MIT NUKLEINSÄUREN.....	23
2.1.1	PCR (Polymerase Chain Reaction).....	23
2.1.2	Phenolisierung und Fällung von DNA	23
2.1.3	Agarose-Gel-/LMP-Gel-Elektrophorese von DNA.....	23
2.1.4	Reinigung von PCR-Produkten aus Agarose-Gel.....	24
2.1.4.1	High Pure PCR-Product Purification Kit (Roche)	24
2.1.4.2	Elution über Glaswolle	25
2.1.5	Restriktion von DNA	25
2.1.6	Dephosphorylierung von DNA-Enden.....	25
2.1.7	Herstellung von blunt ends mittels Klenow-Polymerase.....	25
2.1.8	Ligation von DNA-Fragmenten (sticky ends/blunt ends).....	26
2.1.9	Zielgerichtete Mutagenese.....	26
2.2	SEQUENZIERUNG VON DNA.....	27
2.3	ARBEIT MIT BAKTERIEN	28
2.3.1	Bakterien-Stämme	28
2.3.2	Kulturmedien und Lösungen.....	28
2.3.3	Herstellung elektrokompenter Zellen.....	29
2.3.4	Transformation kompetenter Zellen mittels Elektroporation.....	29
2.3.5	Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli - Klare Lysate.....	29
2.3.6	Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli mit dem JETSTAR-System [®]	30
2.4	ARBEIT MIT EUKARYOTISCHEN ZELLEN.....	31
2.4.1	Zelllinien	31
2.4.2	Kulturmedien und Lösungen.....	31
2.4.3	Kulturbedingungen.....	33
2.4.4	Beschichtung von kleinen Flaschen mit PDL (Poly-D-Lysin).....	33
2.4.5	Passagieren von Zellen	33
2.4.6	Einfrieren von Zellen.....	33
2.4.7	Auftauen von Zellen	33
2.4.8	Fixieren von Zellen	34
2.4.9	Stabile Transfektion von DNA.....	34
2.4.10	Transfektion mit DOSPER (Boehringer Mannheim)	34
2.4.11	Transiente Transfektion mit FuGENE [®] 6 (Roche).....	35
2.4.12	Isolierung von RNA und Proteinen	35
2.4.13	Isolierung von Proteinen.....	36
2.4.14	cDNA-Synthese.....	36
2.4.15	Kinetik der Zelldifferenzierung.....	37
2.4.16	Dokumentation der Morphologie.....	37

2.4.17	Histologische Färbungen.....	37
2.4.17.1	Alkalische Phosphatase-Färbung.....	37
2.4.17.2	Alcian-Blau-Anfärbung der Zellen.....	37
2.4.18	Immunologische Färbungen.....	38
2.4.19	Eindeckeln der angefärbten Zellen.....	38
2.4.20	Dokumentation der angefärbten Zellen.....	38
2.4.21	SDS-Gelelektrophorese.....	39
2.4.22	Anfärbung der Proteine im Gel durch Coomassie Brilliant Blue (CBB).....	40
2.4.23	Westernblot.....	40
2.4.24	Immunmarkierung.....	40
2.5	METHODEN ZUR UNTERSUCHUNG VON INTERAKTIONEN ZWISCHEN PROTEINEN.....	43
2.5.1	Yeast Two-Hybrid-System.....	43
2.5.1.1	Hefestamm (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	44
2.5.1.2	Transformation von BD-Vektoren in Hefezellen.....	44
2.5.1.3	Aminotriazol-Test.....	44
2.5.1.4	β -Galactosidase-Assay : Nachweis von Protein-Protein-Interaktion.....	44
2.5.1.5	Transformation der AD-Vektoren in Hefezellen mit BD-Plasmid.....	45
2.5.1.6	Untersuchung der AD-Plasmide.....	45
2.5.1.7	Verifizierung der positiven Klone.....	46
2.5.2	Co-Immunpräzipitation (Co-IP).....	46
2.5.3	Luciferase-Assay.....	47
2.6	ARBEIT MIT ADENOVIRUS.....	48
2.6.1	Herstellung von Adenovirus mit dem Adeno-X™ Adenoviral Expression System.....	48
2.6.1.1	Klonierung von Zielgenen in pShuttle.....	49
2.6.1.2	Klonierung der Expressionskassette in Adeno-X DNA.....	49
2.6.1.3	Verdau von adenoviraler DNA mit dem Enzym PacI.....	49
2.6.1.4	Transfektion von HEK293LP-Zellen mit CaCl_2 -Lösung.....	49
2.6.1.5	Transiente Transfektion mit FuGENE™ 6 (Roche).....	50
2.6.1.6	Ernte von Virusflaschen (FTL).....	50
2.6.2	Vermehrung und Analyse von Adenoviren.....	50
2.6.2.1	Prä-Infektion 1. Grades.....	50
2.6.2.2	Prä-Infektion 2. Grades.....	51
2.6.2.3	DNA-Isolierung.....	51
2.6.2.4	Protein-Isolierung.....	52
2.6.3	Großproduktion und Aufreinigung von Adenoviren.....	52
2.6.3.1	Infektion von HEK293LP-Zellen mit Adenovirus.....	52
2.6.3.2	Ernte der infizierten HEK293LP-Zellen.....	52
2.6.3.3	CsCl-Gradient und Ultrazentrifugation.....	53
2.6.4	Titration des Virus.....	54
2.6.4.1	Virusvorverdünnung.....	54
2.6.4.2	Titrierung.....	54
3	ERGEBNISSE.....	55
3.1	"GAIN OF FUNCTION/ LOSS OF FUNCTION"-ANALYSEN DURCH ÜBEREXPRESSION VON ROR2-VARIANTEN.....	56
3.1.1	Einfluss der transienten Überexpression von Ror2-Varianten auf das Phosphorylierungsverhalten von MAP-Kinasen.....	56
3.1.2	Einfluss der Überexpression von Ror2-Varianten auf das Differenzierungsverhalten von mesenchymalen Vorläuferzellen.....	58
3.1.2.1	Histologische Färbungen.....	59
3.1.2.2	Untersuchung der Genexpression osteo-/chondrogener Markergene in transfizierten C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen und rekombinant BMP2-exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen (C3H10T $\frac{1}{2}$ _{BMP2}) während der Differenzierung.....	61
3.2	LIGANDEN-ABHÄNGIGE AKTIVIERUNG VON ROR2.....	64
3.2.1	Herstellung eines chimären Rezeptors aus dem CSF1-Rezeptor und Ror2 und Klonierung in den eukaryotischen Expressionsvektor pMT7T3.....	64
3.2.2	CSF-1-abhängige Differenzierung von stabil CSF-1-R/Ror2-Chimäre transfizierten mesenchymalen Vorläuferzellen C3H10T $\frac{1}{2}$	65
3.3	SUCHE NACH POTENTIELLEN ROR2-BINDUNGSPARTNERN IM YEAST TWO HYBRID SCREEN.....	65
3.3.1	Klonierung der N-terminalen/C-terminalen Domänen in den BD-Vektor pGBKT7 des MATCHMAKER Two Hybrid Systems.....	66

3.3.2	b -Galactosidase-Assay/Aminotriazol-Test von transformierten Hefen	66
3.3.3	Transformation der cDNA-Bank in mit BD-Vektor transformierte Hefen	66
3.3.4	b -Galactosidase-Assay/Rotfärbung der doppelt transformierten Hefen	66
3.3.5	Ror2-Protein-Interaktionen.....	67
3.3.6	Verifizierung der positiven Klone aus dem Yeast Two Hybrid Screen mittels Co- Immunpräzipitation in Mammaliazellen.....	68
3.3.7	Versuch der funktionellen Charakterisierung der Ror2-Bprp-Interaktion.....	70
3.4	INTERAKTION MIT BEREITS BEKANNTEN VERTRETEREN VON SIGNALWEGEN DER OSTEO- /CHONDROGENESE.....	71
3.4.1	Ror2 kann mit anderen Rezeptoren oligomerisieren	71
3.4.1.1	Co-Immunpräzipitation von Ror2wt mit unterschiedlichen Knochen-/Knorpel-spezifischen Rezeptoren	72
3.4.1.2	Herstellung eines löslichen intrazellulären Ror2-Rezeptors und Klonierung in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.....	72
3.4.1.3	Co-Immunpräzipitation von Ror2Cterm mit unterschiedlichen Knochen-/Knorpel- spezifischen Rezeptoren	73
3.4.2	Interaktion mit Signalmediatoren.....	75
3.4.2.1	Die MAP3Kinase TAK1 interagiert mit Ror2.....	76
3.4.2.2	TAK1-Bindung an Ror2 interferiert nicht mit der Bindung von Bprp an Ror2.....	77
3.4.2.3	Die Ror2-TAK1-Interaktion führt nicht zu einer Veränderung in der Aktivität von MAPKinase-Signalwegen	79
3.4.2.4	TAK1 phosphoryliert Ror2	80
3.4.2.5	Bprp stimuliert die TAK1-abhängige Phosphorylierung von Ror2	82
3.4.2.6	TAK1 reguliert weitere posttranslationale Modifikationen von Ror2	84
3.4.3	Interaktion von Ror2 mit Faktoren der Wnt-Familie.....	86
3.4.3.1	Co-Immunpräzipitation von Wnts mit unterschiedlichen Varianten von Ror2	86
3.4.3.2	Die kanonischen und nicht-kanonischen Wnt-Bindungen an Ror2 wirken sich unterschiedlich auf die TAK1-Interaktion aus.....	87
3.5	TOP-FLASH-EXPERIMENTE.....	92
3.6	ADENOVIRUS-EXPERIMENTE.....	98
3.6.1	Klonierung von BMP2 und Ror2wt in pShuttle.....	99
3.6.2	Analyse der Prä-Infektionen von AV-lacZ, AV-BMP2 und AV-Ror2 auf DNA- und Protein- Ebene.....	100
3.6.3	Aufreinigung und Titrierung von AV-lacZ, AV-BMP2 und AV-Ror2wt	101
3.6.4	Einfluss der adenoviralen Überexpression von lacZ, BMP2 oder Ror2wt auf das Differenzierungsverhalten von C3H10T ^{1/2} -Zellen	101
3.6.5	Histologische Färbungen.....	102
3.6.6	Untersuchung der Genexpression osteo-/chondrogener Markergene in infizierten C3H10T ^{1/2} - Zellen während der Differenzierung	104
4	DISKUSSION	107
4.1	AUSWIRKUNGEN DER ÜBEREXPRESSION VON ROR2 AUF ENDOGENE SIGNALWEGE.....	107
4.1.1	Überexpression von Ror2 allein induziert nicht die osteo-/chondrogene Differenzierung von C3H10T ^{1/2} -Zellen.....	107
4.1.2	Ror2 stimuliert keine MAP-Kinase-Signalwege.....	108
4.2	PHYSISCHE UND FUNKTIONELLE INTERAKTIONSPARTNER VON ROR2.....	109
4.2.1	Ror2 interagiert mit den Wnt-Signalwegen	109
4.2.2	Ror2 interagiert mit diversen Rezeptoren.....	111
4.2.3	Ror2 interagiert mit Signalmediatoren.....	112
4.2.4	TAK1 interagiert mit Bprp und Ror2.....	113
4.3	FUNKTIONELLE ANALYSEN DER INTERAKTION.....	114
4.3.1	Die Interaktion von Ror2 mit TAK1 wird Wnt-1-abhängig inhibiert.....	114
4.3.2	TAK1wt phosphoryliert Ror2.....	115
5	ZUSAMMENFASSUNG	118
6	ANHANG.....	120
6.1	EINGESETZTE OLIGONUKLEOTIDE.....	120
6.2	EINGESETZTE PLASMIDE.....	123
6.3	VERWENDETE ZELLINIEN	123
6.4	MATERIALIEN UND GERÄTE.....	123

6.4.1	<i>Geräte.....</i>	123
6.4.2	<i>Materialien und Zellkulturmedien.....</i>	124
6.4.3	<i>Enzyme und Chemikalien.....</i>	124
6.5	COMPUTERPROGRAMME/DATENBANKEN (INTERNET).....	124
6.6	ABKÜRZUNGEN.....	125
6.7	LITERATUR.....	126

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1	Endochondrale Ossifikation nach Wallis (1996).....	8
Abbildung 2	Graphische Darstellung von Ror2 mit den entsprechenden Domänen	11
Abbildung 3	Gegenüberstellung von Ror2-Mutanten und den daraus resultierenden Erkrankungen im Menschen.....	13
Abbildung 4	Darstellung der Homologien durch überlagerte Aminosäuresequenzen.....	14
Abbildung 5	Schematische Darstellung der Rezeptoren im TGF- β -Signalweg	16
Abbildung 6	Modell der MAPK-Signalwege	17
Abbildung 7	Darstellung von TAK1 und seine Einbettung in unterschiedliche Signalwege.....	19
Abbildung 8	Schematische Darstellung der kanonischen und nicht-kanonischen Wnt-Signalwege.....	21
Abbildung 9	Schematische Darstellung der Mutagenese mit dem QuickChange [®] Site-Directed Mutagenesis Kit.....	27
Abbildung 10	MATCHMAKER Two-Hybrid System 3	43
Abbildung 11	Schematische Darstellung eines Luciferase-Assays	47
Abbildung 12	Übersicht über die Herstellung von Adenovirus.....	48
Abbildung 13	Schematische Darstellung der Ror2-Varianten	55
Abbildung 14	Transiente Überexpression von Ror2-Varianten führt nicht zur Aktivierung der endogenen MAP-Kinasen p38 und JNK.....	57
Abbildung 15	Chondrozytenfärbung von unterschiedlich transfizierten C3H10T $\frac{1}{2}$ - und C3H10T $\frac{1}{2}$ BMP2-Zellen; Vergrößerung 1:40.....	59
Abbildung 16	Osteoblastenfärbung von unterschiedlich transfizierten C3H10T $\frac{1}{2}$ - und C3H10T $\frac{1}{2}$ BMP2-Zellen; Vergrößerung 1:40.....	60
Abbildung 17	Rekombinante Expression von Ror2-Varianten in C3H10T $\frac{1}{2}$ - (links) und C3H10T $\frac{1}{2}$ BMP2-Zellen (rechts).....	61
Abbildung 18	Einfluss der Überexpression von Ror2-Varianten auf die Expression chondrogener Markergene in C3H10T $\frac{1}{2}$ - (links) und C3H10T $\frac{1}{2}$ BMP2-Zellen (rechts).....	61
Abbildung 19	Einfluss der Überexpression von Ror2-Varianten auf die Expression osteogener Markergene in C3H10T $\frac{1}{2}$ - (links) und C3H10T $\frac{1}{2}$ BMP2-Zellen (rechts).....	63
Abbildung 20	Chimäre kloniert in pMT7T3-Vektor	65
Abbildung 21	Beispiel-Inserts der AD-Vektoren auf 1%igem LMP-Gel.....	66
Abbildung 22	Ror2wt interagiert mit Bprp bzw. Bprp Δ N in der Co-IP, während Ror2 Δ C und Ror2 Δ Tyr dazu nicht in der Lage sind	69
Abbildung 23	Schematische Darstellung der Interaktion zwischen Bprp und Ror2wt	70
Abbildung 24	Transiente Co-Expression von Ror2-Varianten mit Bprp führt nicht zur Aktivierung der endogenen MAP-Kinasen p38 und JNK.....	70
Abbildung 25	Ror2Cterm kloniert in pcDNA3-Vektor	73
Abbildung 26	Ror2 interagiert mit anderen Rezeptoren über seine C-terminalen Domänen.....	73
Abbildung 27	Aktives TAK1 interagiert mit Bprp	75
Abbildung 28	Aktives TAK1 interagiert mit Ror2wt und Ror2Cterm.....	76
Abbildung 29	Schematische Darstellung der Interaktion zwischen TAK1 und Ror2wt	77
Abbildung 30	TAK1-Bindung an Ror2 interferiert nicht mit der Bindung von Bprp an Ror2.....	78
Abbildung 31	Schematische Darstellung der Interaktion von TAK1 und Bprp mit Ror2wt	79
Abbildung 32	Die Co-Expression von Ror2-Varianten führt nicht zu einer Änderung in der TAK1-abhängigen Phosphorylierung der endogenen MAP-Kinasen p38 oder JNK	79
Abbildung 33	Nachweis von Ror2wt und Ror2Cterm mit dem p38*-Antikörper	80
Abbildung 34	Ror2T871A, Ror2Y873A und Ror2T871A/Y873A kloniert in pcDNA3-Vektor	81
Abbildung 35	Mutationen von Ror2wt an Position 871 und/oder 873 führen zu einer Inhibierung der Phosphorylierung im TGY-Motif.....	82
Abbildung 36	Die Co-Expression von Bprp stimuliert die Phosphorylierung des TGY-Motifs in Ror2 durch TAK1wt	83
Abbildung 37	Die posttranslationale Modifikation von Ror2 wird durch aktives TAK1 verändert.....	84
Abbildung 38	Lokalisationsänderung von Ror2 in Gegenwart von TAK1wt	85
Abbildung 39	Co-Immunpräzipitation von Wnts mit unterschiedlichen Varianten von Ror2.....	87
Abbildung 40	Wnt-1-Bindung an Ror2 interferiert mit der TAK1 Bindung an Ror2	88
Abbildung 41	Wnt-5a-Bindung an Ror2 interferiert weniger mit der TAK1 Bindung an Ror2	89
Abbildung 42	Wnt-5a kann die Verdrängung von TAK1 aus der Ror2-TAK1-Interaktion durch Wnt-1 nicht verhindern	90
Abbildung 43	Auswirkungen der Überexpression von Wnt-1, Wnt-5a, TAK1wt, Bprp oder Ror2-Varianten auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors TCF.....	92
Abbildung 44	Auswirkungen der Überexpression von TAK1wt, Bprp oder Ror2-Varianten auf die Wnt-1-abhängige Aktivität des Transkriptionsfaktors TCF.....	93
Abbildung 45	Auswirkungen der Überexpression von TAK1wt und/oder Bprp zusammen mit den Ror2-Varianten auf die Wnt-1-abhängige Aktivität des Transkriptionsfaktors TCF.....	94
Abbildung 46	Auswirkungen der Überexpression von Wnt-5a, TAK1wt, Bprp oder Ror2wt auf die LiCl-abhängige Aktivität des Transkriptionsfaktors TCF.....	96
Abbildung 47	Klonierung des Zielgens in pShuttle	99
Abbildung 48	Verdau mit PI-SceI/ I-Ceu und Darstellung des Adeno-X-Viral-DNA-Vektor	99

Abbildung 49	<i>PacI</i> -Verdau zur Linearisierung der rekombinanten DNA.....	99
Abbildung 50	Darstellung der typischen Morphologie eines Plaques im Anfangsstadium (links) sowie eines fortgeschrittenen Plaques (rechts)	100
Abbildung 51	Proteinanalyse von AV-lacZ, AV-BMP2 und AV-Ror2wt nach 24 h	100
Abbildung 52	Chondrozytenfärbung von mit AV-lacZ, AV-Ror2wt oder AV-BMP2 infizierten C3H10T ^{1/2} -Zellen; Vergrößerung 1:40.....	102
Abbildung 53	Osteoblastenfärbung von mit AV-lacZ, AV-Ror2wt oder AV-BMP2 infizierten C3H10T ^{1/2} -Zellen; Vergrößerung 1:40.....	103
Abbildung 54	Rekombinante und endogene Expression in C3H10T ^{1/2} -Zellen	104
Abbildung 55	Einfluss der rekombinanten Expression von lacZ, BMP2 oder Ror2wt auf die Expression chondrogener (A) und osteogener (B) Markergene in C3H10T ^{1/2} -Zellen.....	105
Abbildung 56	Ror2 interagiert mit Bprp	112
Abbildung 57	Ror2 interagiert mit TAK1wt	114
Abbildung 58	Gegenüberstellung der Interaktion von Ror2 mit verschiedenen Kinasen	116
Tabelle 1	Auflistung der interessantesten Kandidaten für eine Protein-Protein-Interaktion mit Ror2, ermittelt im Yeast Two Hybrid Screen	67
Tabelle 2	Auswertung der Titrierung	101

1 Einleitung

Die Beschaffenheit des Knochenskeletts trägt entscheidend dazu bei, den Menschen als solchen zu definieren. Der aufrechte Gang unterscheidet uns von den Tieren; Gesichtszüge, Gestalt und Größe werden als primäre Identifikationsmerkmale von uns wahrgenommen; Brüche führen oftmals zu Einschränkungen in der Bewegungsfähigkeit oder sogar zum Tode; Mutationen in der Knochenbildung führen immer noch zur gesellschaftlichen Ausgrenzung; chronische Erkrankungen der Gelenke und Knochen sind verantwortlich für Milliarden Schäden im Gesundheitswesen und gelten als die am weitesten verbreiteten Volkskrankheiten.

Das Verständnis für die Entstehung des Knochens und Knorpels während der Embryonalentwicklung, der stetige Umbau des Knochens während des Wachstums, die Reparatur des Knochens nach einer Fraktur oder der Abbau des Knochens im Alter und die an diesen Vorgängen beteiligten, molekularen Mechanismen sind demzufolge von hohem Interesse in Medizin und Forschung.

In den vergangenen Jahrzehnten ist sehr viel über die Entwicklung des Knochens bekannt geworden und nicht zuletzt Dank der Erkenntnisse aus den Genomprojekten in Maus und Mensch sind auch die beteiligten Moleküle zum Großteil bekannt. Die Aufgabe der Zukunft besteht darin, diese einzelnen Mosaiksteine auf molekularer Ebene zusammenzufügen, ihr Zusammenspiel zu verstehen und daraus die notwendigen Erkenntnisse zu ziehen, um darauf basierend therapeutische Anwendungen zu etablieren.

1.1 Der Knochen

Man unterscheidet im wesentlichen zwei verschiedene Arten der Knochenbildung:

1. endochondrale Ossifikation
2. intramembranöse (desmale) Ossifikation

Eine endochondrale Ossifikation durchlaufen die langen Knochen der Extremitäten und des Achsenskeletts, während die Bildung von flachen Knochen wie Gesichts- oder Schädelknochen auf eine intramembranöse Ossifikation zurückzuführen ist.

1.1.1 Endochondrale Ossifikation

Eines der frühesten Ereignisse in der Morphogenese des Skeletts stellt die Differenzierung von undifferenziertem Mesenchym in kondensiertes Mesenchym dar. Diese Bereiche von hoher Zelldichte legen bereits spätere Größe und Form der entstehenden Knochen fest. Zellen im Inneren dieser kondensierten Bereiche des Mesenchyms machen in der Folge dramatische Veränderungen durch und differenzieren zu "Prächondrozyten": Sie wachsen und runden sich ab, das Endoplasmatische Retikulum und der Golgiapparat sind vergrößert und anstelle der mesenchymalen Matrix (Kollagen Typ I und III) wird nun Knorpelmatrix (Kollagen Typ II, IX und XI) sezerniert. Die so entstehenden Knorpelanlagen des Knochens breiten sich schnell aus und spiegeln letztendlich den zukünftigen Knochen in Form und relativer Größe wieder.

Im mittleren Teil dieser Anlagen differenzieren Zellen des Perichondriums in Osteoblasten und beginnen damit eine dünne Knochenschicht um den Knorpel zu bilden, während die Chondrozyten im Inneren hypertroph werden und damit verbunden Kalzium in die umgebene Matrix eingelagert wird. Endothelzellen wandern in das Knorpelgewebe ein und lösen dort die Apoptose der hypertrophen Chondrozyten aus. Einige dieser eingewanderten Zellen

differenzieren zu hämatopoetischen Stammzellen (Knochenmark), andere zu Osteoblasten (knochenbildende Zellen) oder Osteoclasten (knochenabbauende Zellen). Durch diesen Prozess der "endochondralen Ossifikation" wird der hypertrophe Knorpel allmählich durch Knochen ersetzt.

In den langen Knochen (z.B. der Extremitäten) breitet sich die Ossifikation von diesem primären Zentrum in beide Richtungen aus. Zusätzlich bildet sich ein sekundäres Zentrum an den Enden der Knochen aus. Die Ossifikation der primären und sekundären Zentren führt zur Ausbildung einer schmalen Platte zwischen diesen beiden Zentren, der sogenannten Wachstumsfuge, die ihrerseits für das Längenwachstum der Knochen verantwortlich ist.

Während des fötalen Wachstums bis hin zur Pubertät findet das Längenwachstum der Knochen in den Wachstumsfugen durch endochondrale Ossifikation statt. Wie in den frühen Stadien der Knochenbildung dient Knorpel dabei als Vorlage, die durch Knochenmark und Knochen ersetzt wird. Die Wachstumsfuge ist in verschiedene Bereiche unterteilt, wobei sich die darin positionierten Chondrozyten in ihrer Morphologie und ihrem Expressionsmuster klar voneinander abgrenzen.

- In der Reservezone sind die Zellen relativ klein und inaktiv.
- In der anschließenden proliferativen Zone stimulieren lokale und systemische Wachstumsfaktoren die Zellteilung der Chondrozyten.
- Die Ausbreitung der proliferierenden Zellen setzt sich auch durch die Transitionszone hindurch fort, wobei die Zellen wachsen, sich in Gruppen zusammenlagern und beginnen zu hypertrophieren.
- In der Hypertrophen Zone sind die Zellen sehr aktiv, zeigen aber keinerlei Zellteilung mehr. Die Matrix der hypertrophen Zellen wird kalzifiziert und die kleinsten Zellen sterben vermutlich durch kontrollierten Zelltod. Die kalzifizierte Knorpelmatrix wird durch Osteoklasten entfernt und durch Knochen ersetzt. Mit steigendem Alter wird der Knorpelanteil der Wachstumsfuge aufgebraucht und bis zum Ende der Pubertät komplett durch Knochen ersetzt.

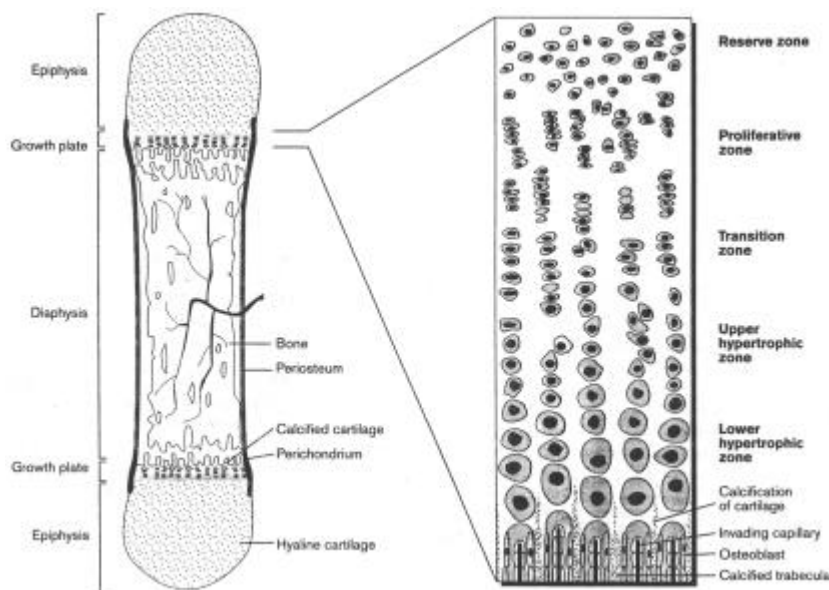


Abbildung 1: Endochondrale Ossifikation nach Wallis (1996)

Graphisch dargestellt ist der Querschnitt eines langen Knochens mit den dazugehörigen Strukturen (links). Vergrößert herausgestellt ist die Wachstumsfuge mit den verschiedenen Stadien der Chondrozytendifferenzierung (rechts).

1.1.2 Intramembranöse Ossifikation

Bei der zweiten Art der Skelettbildung differenzieren ektodermale mesenchymale Zellen direkt zu Präosteoblasten, die Bildung von Knorpelanlagen ist nicht erforderlich. Die sich aus diesen Zellen entwickelnden Osteoblasten bilden aus Kollagenfasern die Knochenmatrix. Die Matrix weist keine bevorzugte Ausrichtung auf, sondern besteht aus einer unregelmäßigen Anordnung der Faserbündel. Bei der intramembranösen Ossifikation ist die Kalzifizierung verzögert und erfolgt nicht in geordneter Weise. Durch Einwanderung von Blutgefäßen wird das hämatopoetische Knochenmark gebildet.

Zu einem späteren Zeitpunkt wird der Geflechtknochen (Periosteum) durch lamellare Knochen ersetzt, dabei wird von einem Remodeling des Knochens gesprochen.

1.1.3 Fehlbildungen

Störungen in einem dieser Schritte zur Skelettentwicklung oder -wachstum kann zu Fehlentwicklungen des Skelettsystems führen. Zum besseren Verständnis werden die auftretenden Fehlbildungen im folgenden Abschnitt in zwei große Kategorien unterteilt, ohne dass diese Einteilung einen Anspruch auf Vollständigkeit oder Exklusivität erhebt (Mundlos und Olsen, 1997). Es ist vielmehr anzunehmen, dass die Kategorien sich überschneiden, da einzelne Gene und ihre Proteinprodukte eventuell verschiedene Funktionen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Skelettbildung ausüben:

A) Fehlbildungen, die mit abnormaler mesenchymaler Kondensation oder Differenzierung in Verbindung gebracht werden können

B) Fehlbildungen, die mit abnormaler Chondrozyten-Proliferation oder -Reifung in Verbindung gebracht werden können

A) Abnormale mesenchymale Kondensation oder Differenzierung

Eine Fehlbildung der Knorpelanlagen kann auf Störungen in der mesenchymalen Kondensation, in der Differenzierung zu Prächondrozyten oder der Differenzierung der Prächondrozyten in gereifte Chondrozyten zurückzuführen sein. Dies kann pathologische Veränderungen (wenn die Anlagen vorhanden, aber in Größe und Form fehlgebildet sind) oder aber auch den kompletten Verlust von Skelettelementen (wenn die Anlagen gar nicht vorhanden sind) zur Folge haben.

Es wurde gezeigt, dass Transkriptionsfaktoren bei dieser Musterbildung des Skeletts eine entscheidende Rolle spielen. Die Familien der Homeobox- (Hox) und der paired-box Transkriptionsfaktoren (Pax) sind hierfür Beispiele:

Die Hox-Gene sind in Clustern angeordnet. Die Anordnung der einzelnen Gene innerhalb eines Clusters entspricht ihrem anteriorposterioren Expressionsmuster (Krumlauf, 1994). Die Ausschaltung oder aber die ektopische Expression von Hox-Genen führt zu fehlenden oder zusätzlichen Skelettelementen oder zur Umwandlung eines einzelnen Elements in ein anderes.

Die Pax-Gene spielen eine wichtige Rolle in der Segmentierung und der Neurogenese (Gruss und Walther, 1992). So verursachen Mutationen in einzelnen Genen dieser Familie schwere Störungen in der Ausbildung der Sklerotome bis hin zum kompletten Verlust von ganzen Wirbelkörpern.

Während Hox- und Pax-Gene die generelle Musterbildung des Skeletts zu beeinflussen scheinen, übernehmen Proteine der TGF- β -Superfamilie (Transforming Growth Factor), zu denen neben TGF- β auch die BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) und GDFs (Growth and Differentiation Factors) gehören, die Regulierung des Musters einzelner Knochen. Unter

anderem führt das Fehlen einzelner BMPs zu Veränderungen in der Größe, Form und Anzahl vieler kleiner Knochen- und Knorpel Elemente (Kingsley et al., 1992; Storm et al. 1994).

B) Abnormale Proliferation oder Reifung von Knorpel

In Knochen, die einer endochondralen Ossifikation entstammen, findet das fötale und postnatale Wachstum in der Wachstumsfuge durch den Austausch von Knorpel gegen Knochen statt. Die Proliferation der Chondrozyten und das Heranziehen von ruhenden Chondrozyten wird durch lokale und systemische Faktoren beeinflusst (z. B. Wachstumshormone).

Der Einfluss von Wachstumshormonen ist indirekt und wird durch IGF 1 (Insulin Growth Factor 1) vermittelt. Störungen im Hormonhaushalt oder Mutationen im Rezeptor haben "Zwergenwuchs" zur Folge, das Fehlen einer ausgeprägten Proliferation führt aber nicht zu in Form und Struktur deformierten Knochen (Liu et al., 1993).

Die FGFs (Fibroblast Growth Factors) und ihre Rezeptoren (FGFRs) sind ebenfalls an der Regulation des Knochenwachstums beteiligt. Die Anzahl an potentiellen Interaktionen zwischen FGFs und FGFRs ist sehr groß, was mit dem komplexen Expressionsmuster, gewebsspezifischem, alternativem Splicing, einer hohen Affinität nur in Gegenwart von anderen extrazellulären Komponenten und der Fähigkeit, Homo- und Heterodimere zu bilden, zusammenhängt (Givol und Yayon, 1992). Knock out-Experimente in Maus zeigen, dass FGFR3 das Längenwachstum von langen Knochen über die Ausdehnung der hypertrophen Zone in der Wachstumsfuge negativ reguliert (Deng et al., 1996).

Die Wichtigkeit der Signalübertragung in und zwischen Zellen der Wachstumsfuge konnte auch anhand von Studien am PTHrP (Parathyroid Hormone related Peptide) gezeigt werden. PTHrP wird ebenso wie sein Rezeptor in verschiedenen adulten und fötalen Geweben, speziell in der Wachstumsfuge aber auch in der Reserve- bzw. der Transitionszone exprimiert (Lee et al., 1993). Es spielt eine wichtige Rolle in der Gestaltung der Proliferation und Differenzierung von Chondrozyten in der Wachstumsfuge.

1.2 Ror2

Mutationen in den oben beschriebenen Genen sind aufgrund ihres Einflusses auf die Skelettentwicklung für einige der bekannten, genetisch vererbten Skeletterkrankungen verantwortlich. Zu diesen Genen gehört auch Ror2 (Regeneron orphan receptor 2), ein Gen, das vor der Veröffentlichung von Takeuchi et al., 2000 nicht mit der Knochenbildung, sondern eher mit der neuronalen Entwicklung in Verbindung gebracht worden war.

1.2.1 Expressionsmuster

In situ-Hybridisierungen zeigten neben dem sich entwickelnden Nervensystem auch Expressionen in den Branchialbögen, im Herzen und den Extremitäten- und Schwanzknospen. Ror2 wird selektiv in den Chondrozyten der Entwicklungsanlagen von allen Knochen exprimiert, die eine endochondrale Ossifikation durchlaufen wie die der Rippen und Extremitäten (nicht in Knochen mit intramembranöser Ossifikation). Nach der Geburt wird Ror2 im artikulären Knorpel, Perichondrium (ebenso im Periosteum) und einem Teil der Chondrozyten der Wachstumsfuge (nicht in hypertrophen Chondrozyten) exprimiert. Ror2 wird nicht im Knochengewebe selbst exprimiert (DeChiara et al., 2000; Matsuda et al., 2001).

1.2.2 Struktur

Im folgenden sollen die molekulare Struktur und eventuell vorhandene Ähnlichkeiten von Ror2 mit anderen Rezeptoren, die wiederum Rückschlüsse auf eine eventuelle Funktion zulassen, näher beleuchtet werden:

- Der extrazelluläre Teil von Ror2 beinhaltet Immunglobulin-artige, Cystein-reiche und Kringle-artige Domänen, welche von einer potenten Sekretionssignalsequenz und einer Transmembrandomäne (TM) begrenzt werden (Masiakowski et al., 1992).
- Die Immunglobulin-artige Sequenz (Ig) ähnelt in ihrem Aufbau der von FGF-Rezeptoren, die wie bereits erwähnt unter anderem an der Knorpelbildung beteiligt sind (Masiakowski et al., 1992).
- Die Cystein-reiche Sequenz (CRD) beinhaltet 10 konservierte Cysteine, die in verschiedenen Molekülen in unterschiedlichen Spezies wiedergefunden werden können. Homologien können unter anderem mit MuSK (Muskel-spezifische Kinase), NSK2 und der Frizzled-Familie von Zelloberflächen-Rezeptoren von Wnts (wingless-related) sowie den sekretierten Antagonisten des Wnt-Signalweges, FrzB und Smoothed festgestellt werden, weswegen diese Domäne in der Folge auch als frizzled-artige Domäne (Fz) bezeichnet wird (Saldanha et al., 1998).
- Die membrannahe Kringle-Domäne (Kr) ist eine stark gefaltete, Cystein-reiche Struktur, die typischerweise in vielfacher Kopie in Blut-Gerinnungs-Proteinen, Apolipoproteinen und Hepatozyten-Wachstumsfaktoren gefunden werden kann. Es wird vermutet, dass diese Domäne in der Protein-Protein-Interaktion eingebunden ist. Die Ror-Familie ist mit Ausnahme der Torpedo-RTK die einzige Familie von RTKs (Rezeptor Tyrosin-Kinasen), von der bekannt ist, dass sie eine solche Domäne in ihrer extrazellulären Region trägt (Wilson et al., 1993).
- Des weiteren hat Ror2 in seinem extrazellulären Teil drei potentielle N-Glycosylierungsstellen (Typ I-Glycoprotein; Masiakowski et al., 1992).
- Der intrazelluläre Teil von Ror2 besteht im wesentlichen aus einer Tyrosinkinase-Domäne, die fast unmittelbar an die Transmembranregion anschließt. Hier zeigt sich eine hohe Übereinstimmung mit den Tyrosinkinase-Domänen in Rezeptoren von Wachstumsfaktoren (Masiakowski et al., 1992).
- Im Anschluss finden sich C-terminal Serin/Threonin- und Prolin-reiche Domänen, deren mögliche Funktion unbekannt ist. Es wird allerdings spekuliert, dass hier eine Interaktion mit Molekülen, die eine SH3 Domäne beinhalten, möglich ist (Oishi et al., 1999).
- In den Mammalia sind die Mitglieder der Ror-Kinase Familie sehr stark konserviert.

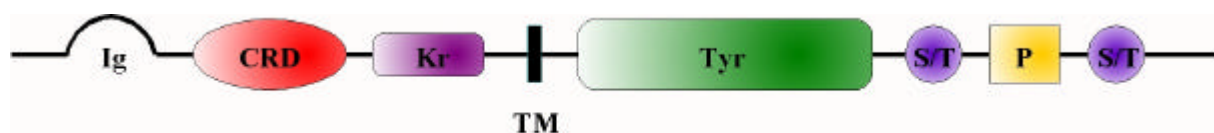


Abbildung 2: Graphische Darstellung von Ror2 mit den entsprechenden Domänen

Extrazellulär: Immunglobulin-artige Sequenz (Ig), Cystein-reiche Sequenz (CRD), Kringle Domäne

Transmembrandomäne (TM)

Intrazellulär: Tyrosinkinase-Domäne (Tyr), Serin-/Threonin-reiche Domänen (S/T), Prolin-reiche Domäne (P)

1.2.3 Brachydaktylie Typ B und Robinow-Syndrom

Mutationen innerhalb des Ror2-Gens wurden als verantwortlich für diverse genetische Erkrankungen ermittelt, im speziellen für Brachydaktylie Typ B (BDB) und das Robinow-Syndrom.

BDB ist eine autosomale, dominante, skelettale Fehlbildung, charakterisiert durch Hyperplasie/Aplasie der endständigen Finger und Zehen sowie deren Nägel. In Patienten mit BDB wurden verschiedenartige heterozygote Mutationen in zwei unterschiedlichen Regionen charakterisiert. Zum einen finden sich Deletionen, die sich präzise dem Ende der Tyrosin-Kinase-Domäne anschließen und mit dem Start der ersten Serin/Threonin-reichen Domäne überlappen. Diese Deletionsmutationen verursachen alle verkürzte Proteine, denen die carboxy-terminalen Serin/Threonin- und Prolin-reichen Domänen fehlen. Zum anderen lassen sich Deletionsmutationen identifizieren, die sich direkt vor der Tyrosin-Kinase-Domäne, aber noch intrazellulär und ohne Einfluss auf die Transmembrandomäne befinden und zu einem vollständigen Verlust des intrazellulären Teils des Proteins führen. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die zuerst erwähnten, distal lokalisierten Deletionsmutationen nach der Tyrosin-Kinase den stärkeren Phänotyp aufweisen (Schwabe et al., 2000).

Außerdem wurde auch ein Fall von homozygoter BDB beschrieben (Schwabe et al., 2000). Der betroffene Patient weist einen sehr starken Phänotyp auf, verbunden mit erheblicher Hypoplasie der Finger, der Metacarpale, der Metatarsale und der Abwesenheit von Nägeln. Zusätzlich hat er vertebrale Anomalien, Brachymelie der Arme und einen ventrikulären, septalen Defekt des Herzens - alles Erscheinungen, die an das Robinow-Syndrom erinnern:

Das autosomale rezessive Robinow-Syndrom stellt eine schwere skelettale Fehlbildung dar, die sich durch verkürzte Extremitäten, defekte Rückensegmente, Brachydaktylie und eine Fehlentwicklung des Gesichts und der externen Genitalien auszeichnet (Afzal et al. 2000).

In Patienten mit rezessivem Robinow-Syndrom wurden verschiedenartige Mutationen in unterschiedlichen intrazellulären und extrazellulären Regionen von Ror2 charakterisiert. Extrazellulär führen sie durch Austausch einzelner Aminosäuren oder durch Kettenabbruch dazu, dass die Cystein-Zusammensetzung in der CRD und der Kringle-artigen Domäne verändert wird, was vermutlich die intramolekulare Disulfidbrückenbildung und Proteinfaltung beeinflusst. Die intrazellulären Mutationen führen entweder durch Kettenabbruch zu einem fast vollständigen Verlust der Tyrosinkinase oder durch Aminosäureaustausch zu einem Verlust der Tyrosinkinaseaktivität (Schwabe et al., 2000).

Die heterozygoten Eltern dieser Patienten zeigen keinerlei Phänotyp, und auch die Haploinsuffizienz weist weder Symptome der BDB oder des Robinow-Syndroms auf, was darauf hindeutet, dass die für das Robinow-Syndrom beschriebenen Mutationen in Ror2 zu einem Funktionsverlust von Ror2 führen, wohingegen die Mutationen in Ror2, die zu einem "gain of function"-Effekt führen, BDB verursachen.

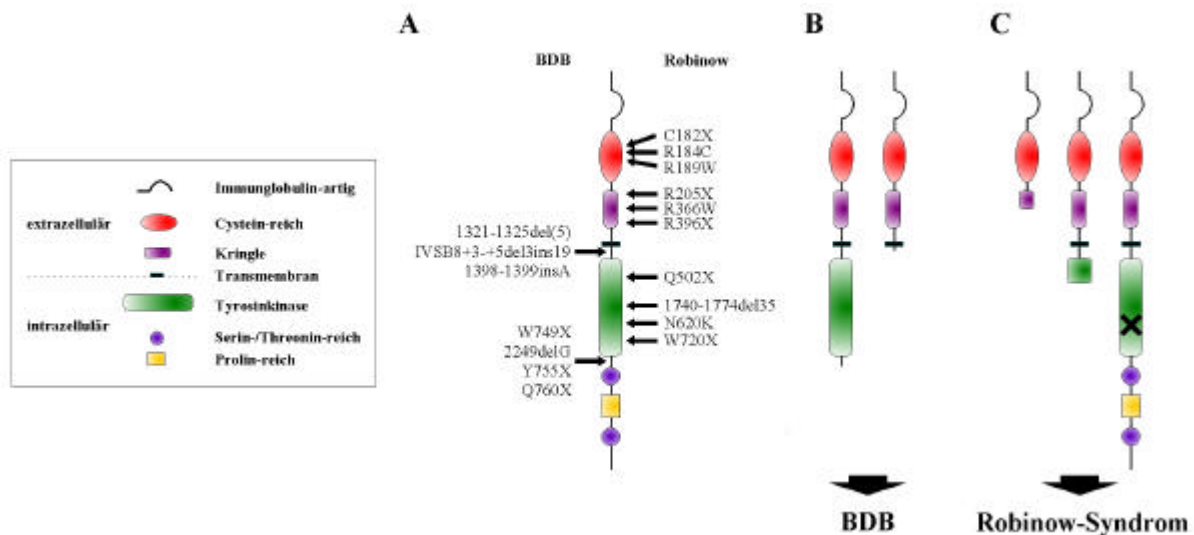


Abbildung 3: Gegenüberstellung von Ror2-Mutanten und den daraus resultierenden Erkrankungen im Menschen

Links: Graphische Darstellung der einzelnen Ror2-Domänen

A: Dargestellt sind die Lokalisationen von distinkten Mutationen in Ror2, die zur Ausprägung der Brachydaktylie Typ B (BDB, links) oder des Robinow-Syndroms (rechts) führen (Schwabe et al., 2000; Afzal et al., 2000; Oldridge et al., 2000; van Bokhoven et al., 2000).

B: Die intrazelluläre Verkürzung von Ror2 um die distalen Serin-/Threonin- und Prolin-reichen Sequenzen (links) ebenso wie der Verlust von allen intrazellulären Domänen (rechts) führt zur dominanten BDB.

C: Im Gegensatz dazu führen die extrazellulären Verkürzungen von Ror2 (links), die intrazelluläre Verkürzung innerhalb der Tyrosinkinase-Domäne (Mitte) oder die selektive Inaktivierung der Tyrosinkinase (X, rechts) zum autosomalen rezessiven Robinow-Syndrom.

1.2.4 Verwandtschaftsgrade (Konservierung im Tierreich)

Ursprünglich beschrieben wurde Ror2 in *Drosophila* als ein in seiner Tyrosinkinase stark homologes Protein zu Vertretern der Trk-Familie von RTKs (Receptor Tyrosine Kinases). In den letzten Jahren konnten allerdings in verschiedenen Organismen innerhalb des Tierreiches homologe Rezeptoren der Ror-Kinase Familie identifiziert werden:

C. elegans:

CAM-1 kodiert ein Mitglied der Ror-Kinase Familie, das Zellwanderung vermittelt und die Polarität von asymmetrischer Zellteilung sowie Axon-Auswüchse orientiert. Im Vergleich zu den Vertretern der Ror-Familie aus Mammalia fehlen hier allerdings die C-terminalen Prolin-reichen Sequenzen (Forrester et al., 1999).

Drosophila melanogaster:

Dror und Dnrk, zwei mögliche neurotrophe Rezeptor-Gene, weisen ebenfalls ein hohes Maß an Homologie (intra- und extrazellulär) auf. Cystein-reiche und Kringle-Domänen sind auch hier vorhanden, aber die immunglobulin-artige und die intrazellulären Serin/Threonin- und Prolin-reichen Sequenzen fehlen. Desweiteren weist die extrazelluläre Domäne 5 N-Glycosylierungsstellen auf, wovon drei mit denen in Ror2 übereinstimmen (Wilson et al., 1993; Oishi et al., 1997).

Xenopus:

Die Übereinstimmung mit Xror2 ist einschließlich der Lage der N-Glycosylierungsstellen sehr hoch (Hikasa et al., 2002).

		IMMUNOGLOBULIN-ARTIGE DOMÄNE	
hRor2	001	MAHGSAIPRRPPLLCIPAVMAAALLLVSRRTSC-EVEVLDPNDPGLPLDGGDGPITIKGYFNFLEPVNNITIVQGGTALHCKVAGNPPFNVRMLKNDAPVVQEPFRITIRKTEYGRS	119
mRor2	001	MAHGWVRPSRVPLCARAVMTAAALLLWTPWTAG-EVDESEADITLQPDGDPSPPLTIKGYFNFLEPVNNITIVQGGTALHCKVAGNPPFNVRMLKNDAPVVQEPFRITIRKTEYGRS	119
Xror2	001	MSH-TRSQNGGIGCALLGLVVAIILPVQA-SQ-EMTIPDNDPLQMESHDRLGATPRGYITLFEVNNITIVQGGTALHCKVAGNPPFNVRMLKNDAPVVQEPFRITIRKTEYGRS	117
hRor1	001	MHR---PRRRGTTPPLALLAALLLAARGAAQCTELSSVAS-LVPTSSWNISSESLKNDSYLLDEPMNITISLQGTALHCKVAGNPPFTIRFKNDAPVVQEPFRITIRKTEYGRS	115
mRor1	001	MHR---PRRRGTTPPLALLAALLLAARGAAQCTELSSVAS-LVPTSSWNISSESLKNDSYLLDEPMNITISLQGTALHCKVAGNPPFTIRFKNDAPVVQEPFRITIRKTEYGRS	115
CAM-1	001	MSRPREDDDLVIETPADDEG-HYGNASMEGTSTGQRPIRLTSQRLNAKSSQDEVRFKALQETPLKFIHLKNGE-EKTKVVKIRDKENS	094
		NIT	
hRor2	120	LRIQDLDTTDTGYQCVATNGKTTITATGVLFY-----RLGPTSPNHNFDQDYHEDGFCQPYRGIACA	183
mRor2	120	LRIQDLDTTDTGYQCVATNGKTTITATGVLFY-----RLGPTSPNHNFDQDDQEDGFCQPYRGIACA	183
Xror2	118	LRIQDLDTTDTGYQCVATNGKTTITATGVLFY-----RLGPTSPNHNFDQDYHKDGFQPYRGIACA	181
hRor1	120	LRIRNLDTTDTGYQCVATNGKVVSTGVLFY-----KFGPPTASPGYSDEYEDGFCQPYRGIACA	179
mRor1	120	LRIRNLDTTDTGYQCVATNGKVVSTGVLFY-----KFGPPTASPGYSDEYEDGFCQPYRGIACA	179
CAM-1	095	LVIETQLVLSGTYQCVISNPAASVNTISVLRNNVNPDAVKLSQKKGSHHSTKHIAFDEYEDYEMMDRGLPDEEDADLYRVPDASAGSNYAVVSEWRWLDGKIRYVDDVQIRGEAR	214
Dror	001	MNKYSAFIVICISLVLFITKLDVGSNVDNRYGQGGSSQIHIHNTITIR	050
Dnrk	001	MAAGQWGVVVERVLGRMVLKNGANLAVLGLCVLFASATHANSLNALIEEPTARRHQRHRRERENNYDAPASRQVK	079
		CYSTEIN-REICHE DOMÄNE	
hRor2	184	RFIGNRTIYV--DSLQM-QGEIENRITAAFTMIGTSTHLSQCSQFAIPSPCHFPVFLQ-----DARSKT	245
mRor2	184	RFIGNRTIYV--DSLQM-QGEIENRITAAFTMIGTSTHLSQCSQFAIPSPCHFPVFLQ-----DARSRA	245
Xror2	182	RFIGNRTIYV--DSLQM-QGEIENRITAAFTMIGTSTHLSQCSQFAIPSPCHFPVFLQ-----DDQTS-	243
hRor1	180	RFIGNRTIYV--ESLHM-QGEIENQITAAFTMIGTSSHLSDKCSQFAIPSLCHYAFPYQ-----DETSSV	241
mRor1	180	RFIGNRTIYV--ESLHM-QGEIENQITAAFTMIGTSSHLSDKCSQFAIPSLCHYAFPYQ-----DETSSV	241
CAM-1	215	QYLSNKFVMYMTNESREE-MYDLDNLRALMLFNGAPTISOKKROLQAQVACHMYKV-----ESD-----	276
Dror	051	DVLSSNAHFVY--SPNLTMDNLERLKAAYGVKESKMDNANRMYALPSLCSSMFIQIRTPERTNLLYFANVATNAQLKNVSIRKRRTSKDKIKNISIFPKKSTIYEDVFSITIS	167
Dnrk	080	EYLTQGVVY--SLEDPTQGWKEQVTTALWDELSTLTGLREAHEKMLCAVAFPN-----HMEQGRA	141
		NRT	
		CYSTEIN-REICHE DOMÄNE	
hRor2	246	PKPRE-----LCRDECVLESDLCQSYTIARSNPLILMR-----LQPKCEALP-MPESDAANCMRIGIP-AERLGRYHQ-----CYNGSGDYRGTASTITSGHQCPWALQ	343
mRor2	246	PKPRE-----LCRDECVLENDLCQSYTIARSNPLILMR-----LQPKCEALP-MPESDAANCMRIGIP-AERLGRYHQ-----CYNGSGDYRGWASTITSGHQCPWALQ	343
Xror2	244	-KPRE-----LCRDECVLENDLCQSYTIARSNPLILMR-----LQPKCEALP-LPESPEAANCMRIGIP-VEKLNRYQ-----CNGSTCIDYRGSVITITSGHQCPWNSQ	339
hRor1	242	PKPRD-----LCRDECVLENDLCQSYTIARSNPLILMR-----LQPKCEALP-QPESPEAANCMRIGIP-MADDPINKNHK-----CNGSTVDYRGVAVITITSGHQCPWNSQ	340
mRor1	242	PKPRD-----LCRDECVLENDLCQSYTIARSNPLILMR-----LQPKCEALP-QPESPEAANCMRIGIP-MADDPINKNHK-----CNGSTVDYRGVAVITITSGHQCPWNSQ	340
CAM-1	277	-----SNNQIVSISKHDDQVQNDQEPSLALAAQHELVGDTPK-----ALFLSLRSS-----TSNCTIPVMSTALQSSPVAEVRNGLHTWCVNSSTQVEGVIAQTSKQCAPM--I	380
Dror	168	PPTRESNLRKRIERLLENELCQKEYALAKRHEVGN-----VGVEDQKLP-QHK-----DCLSLGIT-----IEVDKTEN-----QWEDGSTYRGVAVNSASGKPLRSMWL	264
Dnrk	142	VK-----APLFEDCQATHLQFYVNDWVLIEEKERNMFIRSRGHFRLENNSSIPHYNASMRRRNCSYGLHTELKSEVSYD-----ERNNGRFMTGMNVSSGIPQRRWDTG	246
		NCS	
		KRINGLE-DOMÄNE	
hRor2	344	HPHSHHLSSTDFPELGGGHAICRNPGQMGEGWCFQTKQKNVR-MELCDVPSQSPRRSS-----KMG-ILYILVPSIAIPLVIAICFLFLVCMCRNKQKASASTPQRRQLMASPSQIM	452
mRor2	344	HPHSHRISSTDFPELGGGHAICRNPGQMGEGWCFQTKQKNVR-MELCDVPSQSPRRGS-----KMG-ILYILVPSIAIPLVIAICFLFLVCMCRNKQKASASTPQRRQLMASPSQIM	452
Xror2	340	VPHSHLSNADYFEIIGGGHSYCRNPGQMGEGWCFQTKQKNVR-MELCDIPACTRNT-----KME-ILYILVPSIAIPLVIAICFLFLVCMCRNKQKASASTPQRRQLMASPSQIM	448
hRor1	341	YPHTHTFTALRFPPELNGGHSYCRNPGQMGEGWCFQTKQKNVR-MELCDIPACTSKDS-----KEKNKME-ILYILVPSVAIPLAIAIPLFFICVCRNNQKSSAPVQR-QPKHVRQNV	451
mRor1	341	YPHTHSFTALRFPPELNGGHSYCRNPGQMGEGWCFQTKQKNVR-MELCDIPACTSKDS-----KEKNKME-ILYILVPSVAIPLAIAIPLFFICVCRNNQKSSAPVQR-QPKHVRQNV	451
CAM-1	381	DSTSRDENVHRFPELMSKNCYCRNPGQMGEGWCFQTKQKNVR-MELCDIPACTSKDS-----KEKNKME-ILYILVPSVAIPLAIAIPLFFICVCRNNQKSSAPVQR-QPKHVRQNV	497
Dror	265	MKEI-----SDFFELI-QNYCRNPGSVNSFWCFVDSRERIRIELCDIPACTSKDS-----LWIAITGTTAIIILAILLFLKRTTLMHVMNRNHNINPTSDKN	362
Dnrk	247	YPHKHPQPPVLEHQLLEENYCRNAGCEPHFCYIVDESVRWQH-COLMCPDYVDNAGDLNPTIKMEKFTFSPMIFLAGIGFVVAIVTLEHMLLVYLSKHKDYSQAPAGATAECS	365
		TM	
hRor2	453	EMP-LINQHKQA-KLKEISLS-----AVRFMEELGSDRGKVKYKGLHFGPAPGQ	500
mRor2	453	EMP-LISQHKQA-KLKEISLS-----TVRFMEELGSDRGKVKYKGLHFGPAPGQ	500
Xror2	449	EMP-LMNQHKQA-QPKVKKEISLS-----TVRFMEELGSDRGKVKYKGLHFGTTPGQ	497
hRor1	452	EMSMLNAYKPKS-KAKELPLS-----AVRFMEELGSCAGKIKYKGLHLYLPGM-DH	499
mRor1	452	EMSMLNAYKPKS-KAKELPLS-----AVRFMEELGSCAGKIKYKGLHLYLPGM-DH	499
CAM-1	498	KTRHQNAHCSSAPSVINSAANSAYYRKLNGTSTPMGRVPHVEMTSLLPSAQLGPPPYPMQHLQQAARRFVSQEPIDDNSYKVFETPSOLSVEKIKIGQGVVHSHIYTSGLFAPE	617
Dror	363	IYGNQSLNNAQDAGRGNLONLSDHVALNSKLIERNITLLRINHTLQ-----DVELELELQAGRGKVKQGLQPN-KT	435
Dnrk	366	VSMRGGDCGGNINTSRRTGGNGNTNLAKWGTRIRSTATIHNSCNVALTTVTNVSDAKGTEPNARLEKLEYPRG-----DIVYVRSIQGAGRGVQARAPGLVDEQ	468
		GDXKG	
		TYROSIN-KINASE-DOMÄNE	
hRor2	501	TQAVAKTLKDKAEGFLPREEFHRLAMLRARLOHPNVCLLVVTKDOHLSMISVCSHDLHEFLVMRSPHS-----DVG-STDDRTV-KSALEPDPVHVAQIAAGMEYLSHHV	611
mRor2	501	TQAVAKTLKDKAEGFLPREEFHRLAMLRARLOHPNVCLLVVTKDOHLSMISVCSHDLHEFLVMRSPHS-----DVG-STDDRTV-KSALEPDPVHVAQIAAGMEYLSHHV	611
Xror2	498	TQTVAIKTLKDKVEVALREEFKHAMRSRIQHPNVCLLITVTKDOHLSMISVCSHDLHEFLVMRSPHS-----DVG-STDDRTV-KETLEPADFLHIVTQIASGMEYLSHHV	608
hRor1	500	AQVAVAKTLKDYNNPQOMFEQOQASIMAEHLHPNVCLLVCAVYQEQPVCMLEFENIQDLHEFLVMRSPHS-----DVGCSDSDGTV-KESLDHGFHLTAIQIAAGMEYLSHHF	611
mRor1	500	AQVAVAKTLKDYNNPQOMFEQOQASIMAEHLHPNVCLLVCAVYQEQPVCMLEFENIQDLHEFLVMRSPHS-----DVGCSDSDGTV-KESLDHGFHLTAIQIAAGMEYLSHHF	611
CAM-1	618	PMAVAVAKCNRDVAETNAERQLEQIRAVATFDHPNVILICVCMYDSSLAVPEYVMVHDLHLKVRVPA-----DHDMGGL-----TEANA-----EPLYTATQIALGMEYLSHMF	722
Dror	436	TITVAIKALKNASVQTDQFKREIEISDKKQNVILICVWLNEKPYCMLEFENIQDLHEFLVMRSPHS-----DVGCSDSDGTV-KESLDHGFHLTAIQIAAGMEYLSHHF	611
Dnrk	469	DLVAVAKLKDASDQOMDFEERACILAEFDHPNVILICVQALGRMCLLEFENIQDLHEFLVMRSPHS-----DVGCSDSDGTV-KESLDHGFHLTAIQIAAGMEYLSHHF	576
		ATK	
		S/T-REICHE DOMÄNE	
hRor2	612	VHKDLATRNVLVDKLNKISDLGLFREVVYADYKLLGNLSLPIRMWPEALIMYKGFSDSDIWSYGVVLWEVFSYGLQPYCYSNQDVEMIRNRQVLCPDCCPAWVYALMIECWE	731
mRor2	612	DHKDLATRNVLVDKLNKISDLGLFREVVYADYKLLGNLSLPIRMWPEALIMYKGFSDSDIWSYGVVLWEVFSYGLQPYCYSNQDVEMIRNRQVLCPDCCPAWVYALMIECWE	731
Xror2	609	VHKDLAARNVLVDKLSIKISDLGLFREVVYADYKLLGNLSLPIRMWPEALIMYKGFSDSDIWSYGVVLWEVFSYGLQPYCYSNQDVEMIRNRQVLCPDCCPAWVYALMIECWE	728
hRor1	612	VHKDLAARNILIGEQHLVKISDLGLSREIYSADYRVQSKSLPIRMWPEALIMYKGFSDSDIWSYGVVLWEVFSYGLQPYCYSNQDVEMIRNRQVLCPDCCPAWVYALMIECWE	731
mRor1	612	VHKDLAARNILIGEQHLVKISDLGLSREIYSADYRVQSKSLPIRMWPEALIMYKGFSDSDIWSYGVVLWEVFSYGLQPYCYSNQDVEMIRNRQVLCPDCCPAWVYALMIECWE	731
CAM-1	723	VHRDLATRNCLVGDTRTILADPGLMTSYSGSYKMLHRMWMVRMWSKAELEQRFSEASVWSFGVTLWEIWFQROPYVQASNQVIELVANHLEPEFNCITNIVSLMVECWE	842
Dror	536	VHRDLAARNCLVAGGVKISLDFGLSREIYSADYRVQSKSLPIRMWPEALIMYKGFSDSDIWSYGVVLWEVFSYGLQPYCYSNQDVEMIRNRQVLCPDCCPAWVYALMIECWE	655
Dnrk	579	VHRDLATRNCLINEHMAVLAIFGLSHKILQDYKGDENDFITRMPLSILYNKFSLESVWAYICLWEVFPALQYFSLTHEVVIKYKEGNVGLPNTLSVYALMARRCWR	696
		PROLIN-REICHE DOMÄNE	
hRor2	732	FFSRPRFXKDIESRLRANGNLNYSNSAQTSGASNTTQTSLSLSTSPVSNVSNAR-----VVGPKQKAPFPFC-PCIPMKGQIRRMVPPPOLY-VVNGYQPVPAAGANLNFYVQIPMOM	846
mRor2	732	FFSRPRFXKDIESRLRANGNLNYSNSAQTSGASNTTQTSLSLSTSPVSNVSNAR-----VVGPKQKAPFPFC-PCIPMKGQIRRMVPPPOLY-VVNGYQPVPAAGANLNFYVQIPMOM	846
Xror2	729	FFARPRFXKDITLRLTHNENMYSNSAQTSGASNTTQTSLSLSTSPVSNVSNAR-----VVGPKKTPFPFC-PCIPMKGQIRRMVPPPOLY-VVNGYQPVPAAGANLNFYVQIPMOM	841
hRor1	732	IFSRPRFXKDIEHRLSNEGLSHTSTSTPSCGNATTTQTSLSASPVSNLNPFPNMFPSQGITQCGQIAGIGPPIPNQRFIPINGPII-PSYAAFFA-AHYQAGPFRVQHCFC	849
mRor1	732	IFSRPRFXKDIEHRLSNEGLSHTSTSTPSCGNATTTQTSLSASPVSNLNPFPNMFPSQGITQCGQIAGIGPPIPNQRFIPINGPII-PSYAAFFA-AHYQAGPFRVQHCFC	849
CAM-1	843	NTERPTESESLSSLASPAHSILQHNNAAGSHSGSGAGRPPTHQRGYPSQKLHRRVEGASPLMKRHDANYAYSEDGSDS	928
Dror	656	QSVKRPITDTSNRLKTHGHGFKANPEM	685
Dnrk	697	KESERPGAEINRECIQHSIAESECAML	724
		S/T-REICHE DOMÄNE	
hRor2	847	APQQVPMVMPKSSHHSGSGSTSTGYVTTAPNTIMADR-AALLSEGADDTQNAFEDGAQSTVQAEAEHEEGSVPETELLGICDITLQVDEAQ-VQLEA	943
mRor2	847	APQQVPMVMPKSSHHSGSGSTSTGYVTTAPNTIMADR-AALLSEGADDTQNAFEDGAQSTVQAEAEHEEGSVPETELLGICDITLQVDEAAHVQLEA	944
Xror2	842	MPQIPII-----KFGSHSGSGSTSTGYVTTAPNNIMADR-VALLADGADEALTAEDMSPNPGQEE-----GSVPETELLGICDITLQVDEADTQISET	930
hRor1	850	PKKSRSP-----SS-----ASGSTSTGHWATSLPSSGNSQEAANILLPHMSIPNHPGGMGITVFGNKSQKPYKIDSKQASLLGDSHIGHTESMISABE	937
mRor1	850	PKKSRSP-----SS-----ASGSTSTGHWATSLPSSGNSQEAANILLPHMSIPNHPGGMGITVFGNKSQKPYKIDSKQASLLGDSHIGHTESMISABE	937

Abbildung 4: Homologien von Vertretern der Ror-Kinase Familie (siehe vorherige Seite)

Anhand von überlagerten Aminosäuresequenzen wird die Konservierung von homologen Rezeptoren der Ror-Kinase Familie in verschiedenen Organismen dargestellt (ROT = hohe Konservierung in allen Vertretern der Ror-Familie; GRÜN = Konservierung innerhalb der Vertebraten; BLAU = Konservierung nur innerhalb von Untergruppen).

Diese Expression von Ror2 in diversen Organismen und die Konvergenz im Lauf der Evolution lassen darauf schließen, dass Ror2 eine große Bedeutung im Rahmen von Entwicklungsprozessen zukommt.

1.3 Verbindung mit Signalwegen

Es wurde anhand von verschiedenen Studien (DeChiara et al., 2000; Oldridge et al., 2000; Afzal et al., 2000) gezeigt, dass Ror2 in vivo eine essentielle Rolle in der Osteo-/Chondrogenese und somit in der Skelettbildung von Vertebraten spielt und diverse Mutationen in Ror2 teilweise ganz erhebliche Phänotypen zur Folge haben. Demzufolge wird die Frage nach dem Signalweg bzw. den Signalwegen, in die Ror2 in diesem Zusammenhang involviert ist, und somit die Frage nach potentiellen Interaktionspartnern (intra- und extrazellulär) immer interessanter. Im folgenden Abschnitt werden deshalb Signalwege präsentiert, die bei der Suche nach Interaktionspartnern aufgrund der bisher bekannten Daten ein besonderes Interesse genießen.

1.3.1 TGF- β -Superfamilie

Bislang unveröffentlichte Erkenntnisse von Prof. S. Mundlos et al. (Charité, Berlin) aus der Arbeit mit Ror2 deuten auf eine Interaktion von Ror2 mit GDF5 hin (persönliche Mitteilung). GDF5 ist ein Mitglied der TGF- β (Transforming Growth Factor- β)-Superfamilie (Massagué, 1990), das unter anderem während der frühen Knorpelentwicklung, im Perichondrium und in den Gelenkzwischenräumen exprimiert wird und für die Skelett- und Gelenkentwicklung notwendig ist.

Alle Mitglieder der TGF- β -Superfamilie greifen als sezernierte Signalmoleküle in eine Vielzahl von Wachstums- und Entwicklungsprozessen wie Zellproliferation, Differenzierung, Zellzyklusregulation, Apoptose, Gewebeumbau und -reparatur ein. Sie sorgen in der Embryogenese für die korrekte Achsen- und Musterbildung, induzieren mesodermale Strukturen und spielen eine Rolle bei mesenchymalen und epithelialen Interaktionen.

Die Mitglieder lassen sich in fünf Untergruppen einteilen: die TGF- β -, Activin-, dpp-, 60A- und GDF (Growth and Differentiation Factor)-Unterfamilie (Derynck und Feng, 1997; Wozney und Rosen, 1998), wobei die dpp- und 60A- Unterfamilie sowie auch andere Mitglieder der TGF- β -Superfamilie wie BMP3, GDF1, Vgr-2 (Vg-related) zur DVR-Gruppe (DVR: dpp/Vg-related) zusammengefasst werden.

Zur TGF- β -Unterfamilie gehören TGF- β 1, - β 2, - β 3 und - β 5 (Burt und Paton, 1992), die sowohl inhibitorische als auch stimulierende Effekte auf die Proliferation und Differenzierung bestimmter Zelllinien zeigen (Kingsley, 1994). Zur Untergruppe der Aktivine gehören Inhibin- β A und - β B, welche Homo- oder Heterodimere aus den jeweiligen Untereinheiten bilden können. Außerdem können sie mit Inhibin- α dimerisieren. Heterodimere aus Inhibin- α - und Inhibin- β -Untereinheiten werden als Inhibine bezeichnet. Die Wirkung der Inhibine ist oft der von Aktivinen entgegengerichtet, die beispielsweise an der Mesoderminduktion und Gastrulation während der Embryonalentwicklung von *Xenopus* beteiligt sind (Hemmati-Brivanlou und Melton, 1992). Zur dpp (drosophila decapentaplegic)-Untergruppe zählen dpp (Padgett, et al., 1987), BMP2 und BMP4 (Wozney et al., 1988; Wozney, 1989), das Drosophila-Gen 60A (Wharton et al., 1991; Doctor et al., 1992), BMP5, BMP6, auch Vgr-1

genannt, BMP7, auch OP-1 (Osteogenic Protein 1) genannt, BMP8a, auch OP-2 genannt, und BMP8b (Celeste et al., 1990, Lyons et al., 1989; Özkaynak et al., 1990/1992). Zur 60A-Unterfamilie werden das Drosophila-Gen 60A und homolog in Säugern BMP5 bis BMP8 gezählt, die osteoinduktive Eigenschaften besitzen. Die GDF-Untergruppe besteht aus den Faktoren GDF-5, BMP12, BMP13.

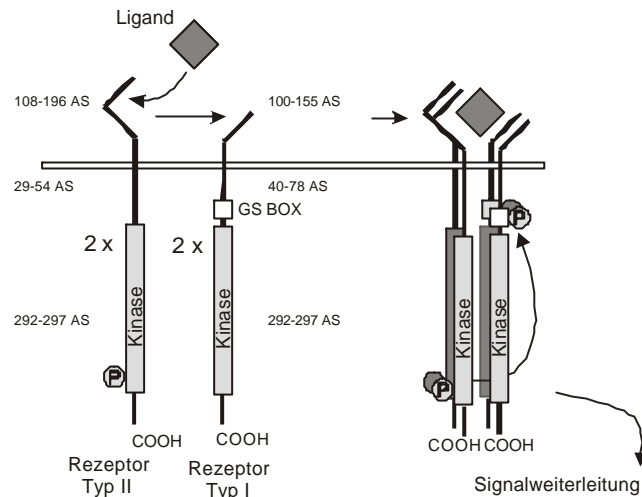


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Rezeptoren im TGF- β -Signalweg
Durch die Liganden-abhängige Bildung eines heterotetrameren Komplexes aus Typ I und Typ II-Rezeptoren kommt es zur Aktivierung des TGF- β -Signalweges

Die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie geben ihr Signal über zwei Typen von Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren weiter. Alle haben eine kurze cysteinreiche extrazelluläre Domäne (Childs et al., 1993), eine hydrophobe Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Serin/Threonin-Kinase-Domäne (Attisano und Wrana, 1996; Massagué, 1996; Miyazono et al., 1994). Die Rezeptoren können aufgrund ihrer Aminosäuresequenz in zwei Gruppen, den Typ I und Typ II Rezeptor, unterteilt werden.

Alle Typ I-Rezeptoren haben eine hoch konservierte sogenannte GS-Box (SGSGSG-Motiv). Ohne Ligand liegen die Rezeptoren als Homodimere auf der Zelloberfläche vor. Der Typ II-Rezeptor ist konstitutiv aktiv (Wrana et al., 1994). Sobald ein Ligand an den Rezeptoren bindet, bildet sich ein heterotetramerer Komplex aus zwei Typ I und zwei Typ II Rezeptoren (Weiss-García und Massagué, 1996). Dabei benötigt der Typ I-Rezeptor für die Ligandenbindung den Typ II-Rezeptor, während dieser den Typ I-Rezeptor für die Signalleitung benötigt. Die Bindungsspezifität des Typ I-Rezeptors hängt vom Typ II-Rezeptor ab. Der Typ II-Rezeptor kann verschiedene Liganden mit unterschiedlicher Affinität binden. Des weiteren kann er auch mit verschiedenen Typ I-Rezeptoren interagieren, wobei diese die Signalgebung des Typ II-Rezeptors ändern können. Der Typ II-Rezeptor ist nun in der Lage, den Typ I-Rezeptor an der GS-Box zu phosphorylieren, und dieser gibt das Signal in die Zelle weiter (Abbildung 5).

Durch Kombinationsmöglichkeiten der Typ I- und Typ II-Rezeptoren wird es der Zelle ermöglicht, verschiedene Signalkaskaden zu aktivieren. Da die Proteine der TGF- β -Superfamilie ebenfalls verschiedene Dimere bilden können, ergibt sich somit eine Vielzahl von Möglichkeiten, mit der die Zellen auf einen bestimmten Faktor reagieren können.

1.3.2 MAP-Kinase-Signalwege

Versuche mit Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie zeigten, dass neben dem in diesem Zusammenhang sehr intensiv untersuchten Smad-Signalweg auch MAPK-Signalwege (MAP-

Zu den BMKs werden das auch als ERK5 bekannte BMK1 (Zhou et al., 1995) und MEK5 gezählt. Trotz der gleichen Phosphorylierungsstelle wie bei ERKs scheinen sie, vergleichbar mit den p38- und JNK/SAPK-MAP-Kinase-Signalwegen, nur in Signalwegen vorzukommen, dessen Auslöser Stressfaktoren wie osmotischer und oxidativer Stress sind. Die Unterschiede zu ERKs liegen dabei in der C-terminalen Region begründet.

p38-MAPKs und JNKs/SAPKs sind bei der Antwort der Zellen auf proinflammatorische Zytokine und auf Stressfaktoren aus der Umgebung wie UV-Strahlung oder Hitzeschock beteiligt. Bei der Signaltransduktion der Apoptose, in der neben bereits erwähnten ERKs auch JNKs/SAPKs eine wichtige Rolle einnehmen, ist die Funktion von JNKs/SAPKs oft entgegengesetzt zu ERKs gerichtet (Derijard et al., 1994; Han et al., 1994; Kyriakis et al., 1994; Chen et al., 1996b; Kyriakis and Avruch, 1996). So ist in einigen Zellsystemen wie PC12-Zellen ERK ein Inhibitor der Apoptose, während JNK/SAPK die Apoptose fördert (Xia et al., 1995).

1.3.2.2 MAP-Kinase-Kinasen (MAPKK)

MAPKKs, auch als MKKs (MAP-Kinase-Kinase) bezeichnet, und MEKs (Mitogen Extracellular-Signal-regulated Kinase Kinase) sind Kinasen, die als Serin/Threonin- und zugleich Tyrosin-Kinasen ("dual specificity kinase") MAPKs phosphorylieren können und selbst durch Phosphorylierung eines Serin-Paares aktiviert werden.

ERK1 wird dabei in Säugern durch MEK1/MKK1, ERK2 durch MEK2/MKK2 (Ahn et al., 1991; Crews et al., 1992; Zheng und Guan, 1993), p38-MAPK durch MKK3/MKK4 (Wu et al., 1997) und JNK1/JNK2 durch MKK4 (Derijard et al., 1995) phosphoryliert und aktiviert. MKK4 wird oft auch wegen seiner Substratspezifität als JNKK1 (JNK Kinase 1) bezeichnet (Lin, A. et al., 1995). Neben JNKK1 gibt es eine zweite Kinase, JNKK2 (Wu et al., 1997), die allerdings p38-MAPK nicht phosphorylieren kann. Homolog zu MKK4/JNKK1 existiert die Kinase SEK1 (SAPK/ERK Kinase 1) (Sanchez et al., 1994; Cano und Mahadevan, 1995), die SAPK, ERK und p38-MAPK phosphorylieren und aktivieren kann. Es scheint bei der Phosphorylierung und Aktivierung von c-Jun während der Entwicklung der Leber in der Embryogenese eine entscheidende Rolle einzunehmen (Ganiatsas et al., 1998). MKK7 (Moriguchi et al., 1997; Yao et al., 1997; Tournier et al., 1997; Wu et al., 1997), auch als JNKK2 bezeichnet (Wu et al., 1997), kann JNK/SAPK phosphorylieren. Weiterhin aktiviert MKK5 ERK5 (Zhou et al., 1995; Tournier et al., 1997) und MKK6 p38-MAPK (Raingeaud et al., 1996; Moriguchi et al., 1996; Han et al., 1996; Stein et al., 1996).

1.3.2.3 MAP-Kinase-Kinase-Kinasen (MAPKKK)

Es gibt eine Vielzahl von MAPKKKs. Dazu zählen MEKK1 bis 4 (MEK-Kinase), Raf, c-Mos, GCK (Germinal Center Kinase), PAK (p21-Activated Kinase), MLKs (Mixed Lineage Kinases) und TAK1 (TGF- β Activated Kinase 1). Ihre Funktion liegt in der Aktivierung von MAPKKs, wobei die einzelnen MAPKKKs dieselben MAPKKs phosphorylieren können. So aktivieren Raf (Moodie et al., 1993; Kyriakis et al., 1992); cMos (Pham et al., 1995), MEKK1 (MEK-Kinase 1) (Lange-Carter et al., 1993) und MEKK3 (Ellinger-Ziegelbauer et al., 1997) MEK1/MEK2 des ERK-Signalweges. GCK kann zusätzlich MKK4 aktivieren und dadurch in den JNK-Signalweg eingreifen (Pombo et al., 1995). PAKs regulieren ebenfalls den JNK-, aber auch den p38-MAPK-Signalweg (Zhang et al., 1995). MEKK3 kann SEK1 aktivieren, greift jedoch nicht in die p38-MAPK Signalkaskade ein (Ellinger-Ziegelbauer et al., 1997).

Aktiviert werden die MAPKKK durch GTP-aktivierte Mediatoren (small G-Proteins), beispielsweise PAKs wie auch MEKK1 und MEKK4 durch Interaktion mit Cdc42-GTP oder

Rac-GTP, bekannt als CRIB (Cdc42/Rac Interactive Binding) (Manser et al., 1994/1995), Raf und MEKK1 durch Ras.

1.3.2.4 TAK1 (TGF- β -aktivierte Kinase 1)

TAK1 steht für TGF- β -aktivierte Kinase 1 und ist zunächst als Mediator des Signalweges von TGF- β -Superfamilienmitgliedern und somit als Teil von Signalwegen, die zur Differenzierung von Zellen beitragen, beschrieben worden. Darüber hinaus übernimmt es auch in der Infektion und Inflammation wichtige integrative Rollen bei der Quervernetzung von Signalwegen.

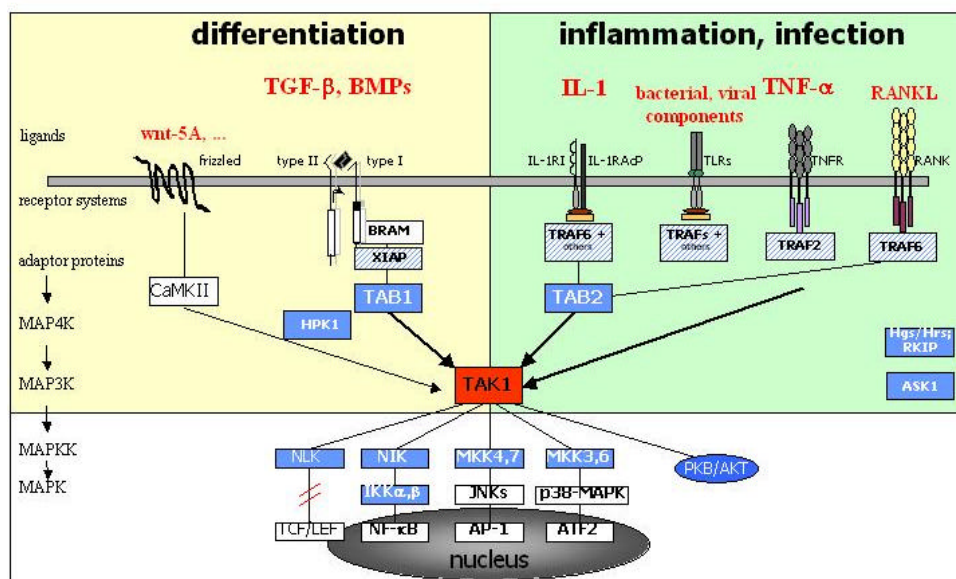


Abbildung 7: TAK1 und seine Einbettung in unterschiedliche Signalwege

Dargestellt sind Signalwege der Differenzierung (links) und der Inflammation (rechts) in denen TAK1 eine zentrale Position in der Regulation von diversen Transkriptionsfaktoren einnimmt.

Im inflammatorischen/infektiösen Bereich kann TAK1 über sogenannte Toll-like Rezeptoren aktiviert werden, die bakterielle und virale Komponenten binden können. Weitere Liganden sind IL-1, TNF- α , RANKL über die zugehörigen Rezeptoren. Zu den Adapterproteinen gehören unter anderem diverse TNF-Rezeptor-assoziierte Faktoren (z.B. TRAF6) und TAB2.

TAK1 seinerseits vermittelt als regulatorische Kinase Aktivierungssignale an verschiedene MAP-Kinase-Signalwege, zu denen der JNK-, der p38- und der NF- κ B-Signalweg gehören. Letzterer spielt in der Regulation der Expression von vielen Genen, unter anderem in der Inflammation, eine wichtige Rolle. Des weiteren hat TAK1 einen Einfluss auf den Wnt-Signalweg, in dem verschiedene Entwicklungsprozesse reguliert werden, wie zum Beispiel die Zell-Zell-Interaktion während der Embryogenese. Durch Aktivierung von TAK1 kommt es via Stimulation von NLK (MAPK-related NEMO-like Kinase) zur Inhibierung der durch β -Catenin und TCF (T-Cell Factor) vermittelten Transkription, was in einer negativen Regulation des Wnt-Signalweges mündet (Ishitani et al., 1999; Hanafusa et al., 1999; Qian et al., 2001).

1.3.3 Wnt-Signalwege (wnt = wingless-related)

Aufgrund der extrazellulären frizzled-artigen Domäne in Ror2 wurde in der Literatur schon seit einiger Zeit über eine potentielle Interaktion mit Wnts und somit eine Einbindung in die Wnt-Signalwege spekuliert. Gestützt wurde diese Hypothese durch den ebenfalls sehr ausgeprägt vorhandenen Einfluss von Wnts auf die Chondrogenese. Eine physiologische und funktionelle Interaktion von Ror2 mit Vertretern der Wnt-Familie sowohl in *Xenopus* als auch in der Maus konnte erst in den Veröffentlichungen von Hikasa et al., 2002 und Oishi et al., 2003 gezeigt werden.

Die Wnt-Familie von sekretierten Glycoproteinen stellt eine stark konservierte Gruppe von Signalmolekülen dar, die vielfältige Entwicklungsprozesse wie Differenzierung, Proliferation, Polarität, Adhäsion und Wanderung von Zellen kontrollieren. Zusätzlich können Störungen im Wnt-Signalweg Entwicklungsdefekte verursachen und sind an der Entstehung von humanen Krebsvarianten beteiligt. Die Untersuchung von Wnt-Funktionen in verschiedenen Organismen ermöglicht den Einblick in die molekularen Mechanismen von zwei unterschiedlichen Signalwegen.

Der kanonische Wnt-Signalweg:

Dieser Signalweg wird eingeleitet durch die Bindung einer Klasse von Wnts (Wnt-1, -2, -3, -8, -8b) an zwei Rezeptormoleküle, zum einen an einen Vertreter der Frizzled-Familie von Rezeptoren (Fz-1), charakterisiert durch 7 Transmembran-Domänen, und zum anderen an ein Lipoproteinrezeptor-verwandtes Protein (LRP-5, LRP-6).

Fehlt das Wnt-Signal, wird die Konzentration von cytoplasmatisch vorhandenem β -Catenin durch Abbau niedrig gehalten. Dabei wird β -Catenin, gebunden in einem Komplex aus Axin und dem adenomatous polyposis coli (APC) protein, durch die Serin/Threonin-Kinase Casein Kinase I (CKI) und die Glykogensynthase-3 β (GSK-3 β) kombiniert phosphoryliert und somit der Ubiquitynylierung und Degradation durch das 26S-Proteasom zugeführt (Abbildung 8).

Die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs führt zu einer Aktivierung von Dishevelled und damit verbunden zu einer Inhibierung der GSK-3 β -Aktivität. In der Folge kann β -Catenin nicht länger abgebaut werden und reichert sich cytoplasmatisch an, was in einer nukleären Translokation von β -Catenin resultiert. Im Kern bilden sich mit steigender β -Catenin-Konzentration Komplexe mit Vertretern der T-cell factor/lymphoid enhancer factor (TCF/LEF)-Transkriptionsfaktoren, was eine regulatorische Expression von Zielgenen zur Folge hat (Nelson und Nusse, 2004; Abbildung 8).

Der nicht-kanonische Wnt-Signalweg:

Im Gegensatz zum kanonischen Signalweg wird hier durch eine andere Klasse von Wnts (Wnt-4, -5a, -5b, -6, -7a, -11) über die Interaktion mit Frizzled-Rezeptoren (Fz-2, -5) die intrazelluläre Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen eingeleitet. Ca^{2+} -abhängige Enzyme wie Proteinkinase C (PKC) und die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII) werden dadurch aktiviert und können ihrerseits die TGF- β -aktivierte Kinase 1 (TAK1) aktivieren. In der Folge wird die NEMO-ähnliche Kinase (NLK) aktiviert, die ihrerseits die TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren phosphoryliert und dadurch die Interaktion des β -Catenin-TCF-Komplexes mit der DNA (siehe kanonischer Signalweg) verhindert. Demzufolge wird der kanonische Wnt-Signalweg durch den nicht-kanonischen negativ reguliert (Miller et al., 1999; Abbildung 8).

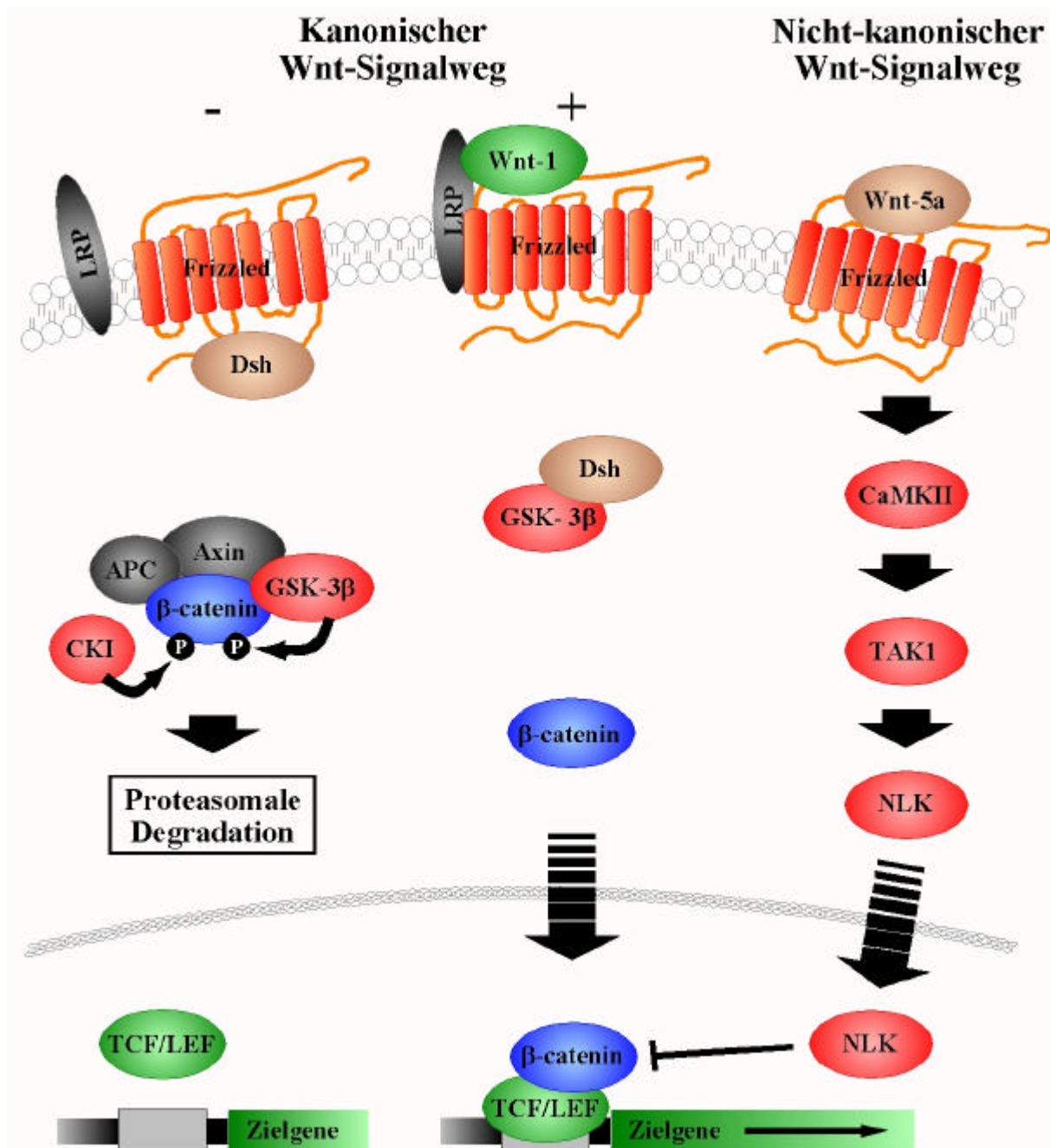


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Wnt-Signalwege

Links: Ohne Stimulation durch einen Vertreter der kanonischen Wnt-Familie wird β -Catenin abgebaut (-).

Mitte: Extrazelluläre Stimulation mit Wnt-1 führt über die Anreicherung von β -Catenin zur Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges (+).

Rechts: Die Aktivierung des nicht-kanonischen Wnt-Signalweges führt zur Inhibition des kanonischen Wnt-Signalweges.

Gegenwärtige Studien zeigen, dass dieses Modell der Wnt-Signaltransduktion bei weitem nicht vollständig ist, sondern dass weitere Signalwege durch Wnt stimuliert werden können und verschiedene Querverbindungen zwischen diesen Signalwegen ebenfalls zum Tragen kommen.

1.4 Fragestellung

Die entwicklungsbiologischen Studien an Mensch und Tier zeigen, dass die Rezeptor Tyrosin-Kinase Ror2 eine entscheidende Rolle in der Chondrogenese und somit in der Skelettentwicklung spielt. Mutationen, die in einem verkürzten Genprodukt resultieren, haben teilweise erhebliche Auswirkungen auf die korrekte Ausbildung der Extremitäten und des Achsenskeletts (BDB, Robinow-Syndrom). Bei der Analyse dieser Effekte gilt es zwischen den membrangebundenen extrazellulären und den intrazellulären Domänen genau zu unterscheiden, da offensichtlich beide Bereiche ähnliche funktionelle Einflüsse ausüben, sich aber trotzdem in ihrer Funktion klar voneinander unterscheiden ("gain of function" kontra "loss of function").

Trotz des Wissens über die Funktion von Ror2 und die Auswirkungen von Mutationen auf die Embryonalentwicklung in vielen Organismen ist nur sehr wenig über die Signalwege bekannt, in die Ror2 involviert ist. So waren bis vor kurzem weder Liganden noch intrazelluläre Interaktionspartner von Ror2 in der Literatur beschrieben. Mit den Veröffentlichungen von Hikasa et al., 2002 und Oishi et al., 2003 wurden vor kurzem erstmals Liganden beschrieben, die mit Ror2 eine physische und funktionelle Interaktion eingehen, und Ror2 als ein Mitglied des nicht-kanonischen Wnt-Signalwegs postuliert.

In der vorliegenden Doktorarbeit sollen neue physische Interaktionspartner für Ror2 (intra- und extrazellulär) mittels Co-Immunoprecipitation und Yeast Two Hybrid Screen identifiziert und verifiziert werden. Dabei sollen anhand von Deletionsmutanten auch die Bereiche, die für diese Interaktionen verantwortlich sind, weiter eingegrenzt werden. Nach Möglichkeit sollen diese physischen Interaktionen durch funktionelle Analysen bestätigt werden. Dabei kommt es uns vor allem auf die Aktivierung und somit auf die Identifizierung von Signalwegen an, die Ror2-abhängig reguliert werden. Zu diesem Zweck sollen Veränderungen im Phosphorylierungsmuster von Signalwegen (Immunfluoreszenz) ebenso wie die Aktivität von Transkriptionsfaktoren (Reportergen) dokumentiert werden.

Aufgrund der Auswirkungen von Mutationen in Ror2 auf die embryonale Skelettentwicklung in vivo, stellt sich die Frage inwieweit die Überexpression von Ror2wt bzw. eine seiner putativ dominant negativen Varianten Einfluss auf die osteo-/chondrogene Entwicklung einer mesenchymalen Vorläuferzelllinie (C3H10T $\frac{1}{2}$) ausübt („gain of function“ kontra „loss of function“). Die Auswirkungen dieser Überexpression sollen anhand von histologischen Färbungen und der Expression spezifischer Markergene untersucht werden. Dabei kommen unterschiedliche Expressionsmodelle zum Einsatz: Zum einen die stabile plasmid-basierende Transfektion und zum anderen die transiente Infektion mit Adenovirus.

Ziel ist es, anhand der Erkenntnisse aus dieser Dissertation einen tieferen Einblick in die Ror2-abhängigen Signalwege zu bekommen, um auf dieser Basis ein besseres Verständnis für die Vorgänge, die zur osteo-/chondrogenen Differenzierung während der Embryogenese beitragen, zu erlangen.

2 Material und Methoden

2.1 Allgemeine Methoden im Umgang mit Nukleinsäuren

(Maniatis, 1989)

2.1.1 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Zur Vervielfältigung (Amplifikation) spezifischer DNA-Sequenzen kommt die 1984 von Kary Mullis entwickelte PCR zum Einsatz:

Strangtrennung: Durch kurzzeitiges Erhitzen der DNA-Lösung auf ca. 94°C werden die beiden Stränge der ursprünglichen DNA getrennt.

Hybridisierung der Primer: Nach schnellem Abkühlen der Lösung auf Annealingtemperatur, die sich aus den verwendeten Primern berechnen lässt, können die Primer mit jeweils einem Einzelstrang der DNA hybridisieren. Da die Primer im großen Überschuss zugegeben werden, erfolgt praktisch keine Rückbildung des Doppelstranges aus den beiden Einzelsträngen.

DNA-Synthese: Nach Erhitzen der Lösung auf optimale Reaktionstemperatur der Taq-Polymerase (72°C) kommt es durch die Polymerase zur Verlängerung beider Primer in 5'-3'-Richtung. Die Folge ist die Replikation beider Zielstränge.

Diese 3 Schritte können mehrmals hintereinander durchgeführt werden (Zyklen). Dabei dient auch jeder neu synthetisierte DNA-Strang als Matrice, es kommt zur exponentiellen Vervielfältigung der DNA (2^n -fache Vermehrung, n = Zyklen).

2.1.2 Phenolisierung und Fällung von DNA

Die DNA-Lösung, die aufgereinigt und entsalzt werden soll, wird mit TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,1 mM EDTA) auf ein Endvolumen von 50 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 50 µl 50% (v/v) Phenol/48% (v/v) Chloroform/2% (v/v) Isoamylalkohol wird der Mix vorsichtig gevortext und anschließend 45 sec bei 20.000 x g, RT zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase, die die DNA enthält, wird bis zur Interphase vorsichtig abgenommen. Die untere, Phenol-haltige Phase wird mit weiteren 50 µl TE-Puffer versetzt, wieder gevortext und ein weiteres Mal für 45 sec bei 20.000 x g, RT zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wird mit der wässrigen Phase der ersten Extraktion vereint (Gesamtvolumen ca. 100 µl), mit 0,1fachem Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,7 und 2,5fachem Volumen abs. Ethanol versetzt und bei -70°C oder über Nacht bei -20°C inkubiert. Nach Zentrifugation von 60 min bei 20.000 x g, 4°C wird die sedimentierte DNA zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen (Rezentrifugation bei 20.000 x g, 4°C für 1-5 min); die Überstände werden verworfen. Die DNA wird bei 37°C im Inkubator getrocknet und anschließend in TE-Puffer resuspendiert.

2.1.3 Agarose-Gel-/LMP-Gel-Elektrophorese von DNA

TAE-Puffer: 40 mM Tris-Acetate; 2 mM EDTA; pH 8,0

**TAE-Puffer
lowEDTA:** 40 mM Tris-Acetate; 0,1 mM EDTA; pH 8,0
(für direkte Elution von DNA aus dem Gel)

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten verschiedener Größe werden Agarosegele in entsprechenden Konzentrationen (0,5% bis 2,0%) eingesetzt. Dazu wird Agarose in TAE-

Puffer bzw. TAE-Puffer lowEDTA unter Kochen gelöst. Die flüssige Agarose wird in eine Gelkammer gegossen und die Kämme für die Geltaschen eingesetzt. Nach dem Festwerden des Gels kann dieses in eine mit TAE-Puffer bzw. TAE-Puffer lowEDTA gefüllte Elektrophorese-Kammer eingesetzt werden. Es werden die Proben in Probenpuffer (20% (w/v) Ficoll; 0,1% (w/v) Orange-G in TE-Puffer) und Längenmarker aufgetragen und die Elektrophorese bei 100 bis 200 V durchgeführt (ideal 5 V pro cm). Unter UV-Licht bei 360 nm können anschließend DNA-Banden ab ca. 20 ng im Gel identifiziert und fotografiert werden. Für die Aufreinigung von DNA aus Gelen nach Gelelektrophorese eignet sich ein LMP-Agarose-Gel (low melting point). Zuerst wird ein 1%iges Agarose-Gel mit Geltaschen hergestellt, aus dem ein Bereich unterhalb der Geltaschen herausgeschnitten wird, der mit LMP-Agarose-Gel aufgefüllt wird. Die Elektrophorese findet bei geringerer Spannung statt, da ansonsten die Wärmeentwicklung ein Schmelzen des LMP-Gels verursachen könnte.

2.1.4 Reinigung von PCR-Produkten aus Agarose-Gel

2.1.4.1 High Pure PCR-Product Purification Kit (Roche)

In Gegenwart eines chaotropen Salzes werden Nukleinsäuren durch die Zerstörung der geordneten Struktur der Wassermoleküle und deren Interaktion mit den gelösten Nukleinsäuren an Glasfaser- oder Silica-Oberflächen gebunden. Da nur die Nukleinsäuren an das Säulenmaterial gebunden werden, können durch einen Waschvorgang andere Stoffe und Verunreinigungen wie Salze, nicht abgetrennte Primer, freie Nukleotide und Proteine, Mineralöl und thermostabile Polymerasen abgetrennt werden. Diese könnten nachfolgende enzymatische Reaktionen hemmen. Die Mindestlänge der zu bindenden DNA muss 100 bp sein. Durch einen Elutionsvorgang mit Niedrigsalzpuffer oder Wasser kann dann die gereinigte DNA wieder eluiert werden und steht für Klonierungsexperimente, Markierungsreaktionen oder DNA-Sequenzierungen zur Verfügung.

Bindungspuffer: 3 M Guanidin-Thiocyanat; 10 mM Tris-HCl; 5% (v/v) Ethanol; pH 6,6

Waschpuffer: 20 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl; 80% (v/v) Ethanol; pH 7,5

Elutionspuffer: 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0

Zu 100 mg Gel werden 300 µl Bindungspuffer gegeben. Bei größeren Mengen an Gel muss die Menge an Bindungspuffer proportional erhöht werden. Um die Bestandteile des Gels vor der eigentlichen Reinigung der DNA zu lösen, wird der Ansatz 15 min bei 56°C inkubiert, alle 2-3 min gemischt und nach Abkühlen mit 150 µl Isopropanol/100 mg Gel versetzt.

Nach Einsetzen des High Pure Filtrationsgefäßes in ein Auffanggefäß wird die Probe in das obere Reservoir einpipettiert und anschließend bei 13.000 x g 30 sec zentrifugiert. Der Durchlauf wird verworfen, in das obere Reservoir werden 500 µl Waschpuffer gegeben und der Ansatz erneut bei 13.000 x g, 30 sec zentrifugiert. Der Durchlauf wird wieder verworfen, die DNA wird ein zweites Mal nun mit 200 µl Waschpuffer gewaschen. In ein neues Auffanggefäß wird dann nach Aufgabe von 50 µl (max. 100 µl) 60°C-warmen Wasser oder Elutionspuffer und Zentrifugation bei 13.000 x g, 30 sec die DNA eluiert. Durch einen zweiten Elutionsschritt kann die DNA-Ausbeute erhöht werden. Das Eluat kann in der Speedvac oder durch Alkoholpräzipitation konzentriert werden.

2.1.4.2 Elution über Glaswolle

Das Gelstück wird in ein Eppendorf-Gefäß übertragen, dessen Boden zuvor mit einer Kanüle durchstoßen und das Loch mit Glaswolle verstopft wurde. Anschließend kann durch Zentrifugation bei 13.000 x g, RT, 5 min die DNA in ein Auffanggefäß eluiert werden, während die Agarose in der Glaswolle zurückgehalten wird.

2.1.5 Restriktion von DNA

DNA kann mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen, die spezifisch Spaltstellen erkennen, geschnitten werden. Viele dieser Spaltstellen besitzen eine zweifache Rotationssymmetrie, die erkannten Sequenzen sind Palindrome und die Schnittstellen symmetrisch angeordnet. Bei Erkennung der Basenabfolge lösen Restriktionsendonukleasen die Phosphodiesterbindung zwischen den Nukleotiden, so dass DNA-Enden mit einer 3'-Hydroxyl- und einer 5'-Phosphatgruppe entstehen. Die Spaltung kann abhängig vom eingesetzten Enzym in überhängenden Enden (sticky ends) oder stumpfen Enden (blunt ends) resultieren. Spaltungen von DNA mit Restriktionsendonukleasen werden in der Regel in Restriktionspuffer mit 10-20 mM Tris-HCl (pH 7,5); 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT und unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen durchgeführt. Die genaue Zusammensetzung richtet sich nach dem eingesetzten Enzym.

Oft wird DNA mit zwei verschiedenen Enzymen gleichzeitig gespalten, so dass bei Spaltung von Vektoren lineare DNA-Moleküle entstehen, deren Enden nicht mit sich selbst ligieren können. Für Ligationen werden die einzubauenden Inserts ebenfalls im Doppelverdau gespalten, so dass deren Enden zu denen des Vektor komplementär sind und eine Ligation stattfinden kann (siehe Kapitel 2.1.8).

Für einen Standard-Restriktionsverdau werden bei einem Endvolumen von 20 µl maximal 4 µg DNA, 2 µl 10x Restriktionspuffer, 1 µl BSA (2 mg/ml) und 5-10 U Enzym eingesetzt. Der Ansatz wird mit H₂O auf 20 µl Endvolumen eingestellt und bei 37°C im Inkubator für 2 bis 4 Stunden bei Restriktion von Vektoren oder über Nacht bei Restriktion von Inserts inkubiert. Anschließend werden die Spaltprodukte phenolisiert, gefällt und gegebenenfalls Aliquots auf ein 1%iges Agarose-Gel aufgetragen, um die Spaltung beurteilen zu können (siehe Kapitel 2.1.3).

2.1.6 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Zur Dephosphorylierung von 5' DNA-Enden - blunt oder sticky Enden - wird alkalische Phosphatase (Shrimp Alkaline Phosphatase, USB) eingesetzt. Diese verhindert die Re-Ligation der gespaltenen Vektor-DNA. Für die Reaktion werden zu 5 µg der zu dephosphorylierenden DNA 1-2 U Alkalische Phosphatase gegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Zur Deaktivierung des Enzyms wird der Reaktionsansatz für 15 min auf 65°C erhitzt. Der Ansatz wird zur Entfernung des Enzyms mit Phenol/Chloroform extrahiert und anschließend gefällt.

2.1.7 Herstellung von blunt ends mittels Klenow-Polymerase

Wenn eine Ligation von zwei DNA-Enden mit nicht komplementären sticky ends beabsichtigt ist, wird es notwendig, die überhängenden Enden zunächst mit der Klenow-Polymerase aufzufüllen und erst dann die Ligation der blunt ends durchzuführen.

Ein Standard-Reaktionsansatz besteht aus dem Volumen, das aus dem Restriktionsverdau bzw. der anschließenden Dephosphorylierung hervorgegangen ist (ca. 20 µl) und wird mit 2,25 µl 10fach-Puffer von MBI, 0,56 µl 2 mM dNTPs und 10 U Klenow-Polymerase (von MBI) versetzt. Dieser Ansatz wird 10 min bei 37°C und 10 min bei 75°C inkubiert.

Anschließend empfiehlt sich eine Phenolisierung und Fällung der DNA sowie eine Aufreinigung über ein LMP-Gel (siehe Kapitel 2.1.2 – 2.1.4).

2.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten (sticky ends/blunt ends)

Ligation ist die Bildung einer kovalenten Bindung (Phosphodiesterbindung) zwischen übereinstimmenden Enden zweier, gewöhnlich doppelsträngiger DNA-Moleküle. Katalysiert wird dieser Vorgang, die Bildung von 3'→5'-Phosphodiesterbindungen zwischen dem 3'-Hydroxyende des einen Restriktionsfragments und dem 5'-Phosphatende des anderen Restriktionsfragments, durch Ligasen. Bei der sticky-end-Ligation besitzen die DNA-Fragmente komplementäre, einzelsträngige Enden, die eine Basenpaar-Bildung ermöglichen, so dass die Ligase nur die beiden Lücken jedes Stranges, auch nicks genannt, aufheben muss. Bei einer blunt-end-Ligation liegen keine komplementären, einzelsträngigen Enden vor, so dass keine gerichtete Ligation durchgeführt werden kann. Die Ligationsreaktion kann entweder intermolekular, Ligation eines DNA-Moleküls an ein anderes (Kinetik der 2. Ordnung), oder intramolekular, Ligation der Enden desselben Moleküls, Ringschluss (Kinetik der 1. Ordnung), verlaufen. Die Erniedrigung des Volumens erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass sich zwei DNA-Moleküle verbinden, aber verändert nicht die Wahrscheinlichkeit des Ringschlusses. Es erhöht sich aber die Anzahl intermolekularer Ligationen gegenüber intramolekularen Ligationen.

Anhand der Größen von Insert und Vektor, in welchen das Insert ligiert werden soll, kann das DNA-Mengenverhältnis der Ligation bestimmt werden. Vom Insert kann dabei die ein- bis vierfache molare Menge eingesetzt werden. Entsprechend den berechneten Mengen an Insert und Vektor werden die DNA-Lösungen miteinander gemischt, der Ansatz mit TE-Puffer auf ein Endvolumen von 8,0 µl gebracht, 2 min bei 56°C inkubiert und später auf Eis gehalten. Nach Zugabe von 1,0 µl 10fach Ligase-Puffer (Promega) und 1,0 µl T4-DNA-Ligase (Promega, Kat. Nr. M1801, 3 U/µl) wird der Ansatz bei einer sticky-end-Ligation über Nacht bei 4°C inkubiert (bei einer blunt-end-Ligation findet die Ligation über Nacht bei RT statt) und am nächsten Tag durch Fällung aufgereinigt, da der Ligationsmix reich an Salzen ist, so dass eine daran folgende, erfolgreiche Transformation des Ansatzes über Elektroporation schwierig ist. Als Kontrolle, wie stark die Koloniebildung allein durch den Vektor erfolgt (background), kann Vektor ohne Insert im Ligationsansatz verwendet werden.

2.1.9 Zielgerichtete Mutagenese

Zum Austausch von Nukleotiden zur zielgerichteten Mutagenese wird das QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene (Kat.Nr.: #200518) eingesetzt. Hierbei dienen ein entsprechendes Oligonukleotid und sein revers komplementäres Pendant, welche neben komplementären Bereichen zentral nicht-komplementäre, geänderte Nukleotide aufweisen, als Ausgangspunkt zur jeweils komplementären Synthese der Plasmidstränge durch eine thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerase. Nach zyklischer Synthese der mutierten DNA-Stränge werden die parentalen, methylierten Stränge durch ein entsprechendes Restriktionsenzym geschnitten (Abbildung 9). Mit dieser Methode können Punktmutationen, Aminosäureaustausche, Deletionen und Insertionen in doppelsträngigen Plasmiden eingeführt werden.

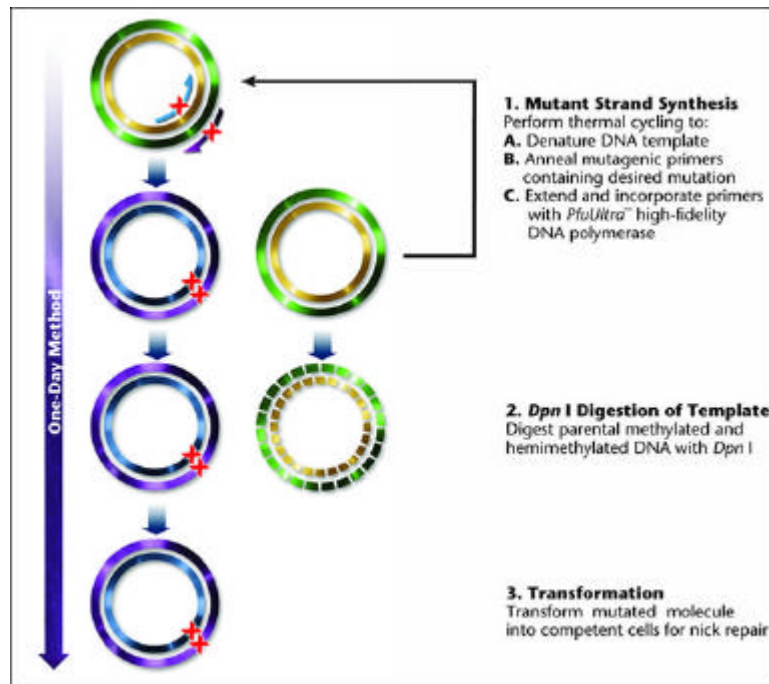


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Mutagenese mit dem QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit
1 = Synthese des mutagenisierten Stranges; 2 = Verdau des parental Plasmids; 3 = Transformation in kompetente Zellen (<http://www.stratagene.com/webimages/QCLinearAmp2.jpg>)

Zur Mutagenese werden 10 ng des zu mutierenden Plasmids, 2,5 µl 10x Puffer (100mM KCl, 100 mM (NH₄)SO₄, 200mM Tris-HCl (pH 8,8), 20 mM MgSO₄, 1% Triton X-100, 1 mg/ml BSA), jeweils 5,5 pmol der Oligonukleotide („forward“ und „revers“) und 0,5 µl dNTPs in einem PCR-Reaktionsgefäß mit H₂O auf ein Endvolumen von 25 µl eingestellt. Der Reaktionsansatz wird mit 0,5 µl PfuTurbo® DNA-Polymerase (Kat.Nr.: #600250) versetzt und gemischt. Die Reaktion wird in einem PCR-Gerät mit 30 sec Denaturierung und 16 Zyklen mit 30 sec Denaturierung bei 95°C, 1 min Oligonukleotid-Hybridisierung bei der entsprechenden Bindungstemperatur und 2 min pro Kb des Plasmids zur Synthese des komplementären Stranges durchgeführt. Im Anschluss an die Mutagenesereaktion erfolgt der Verdau der parental Plasmid-DNA durch Zugabe von 10 U des Restriktionsenzym Dpn I; der Verdau wird für 1 h bei 37°C durchgeführt. Für die Transformation der kompetenten Zellen wird 1 µl des Restriktionsansatzes eingesetzt (siehe Kapitel 2.3.4).

2.2 Sequenzierung von DNA

Das hier verwendete, von der Firma PE Applied Biosystems entwickelte Sequenzierungskit besteht aus der AmpliTaq DNA-Polymerase und aus 2',3'-Didesoxynukleotiden (ddNTP), gekoppelt an 4 Fluorescein- und Rhodamin-Derivate, die eine Detektion bei verschiedenen Wellenlängen erlauben. AmpliTaq ist eine Variante der hitzestabilen DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *thermophilus aquaticus* mit einer Punktmutation im aktiven Zentrum, welche zu einer verringerten Unterscheidungsfähigkeit bezüglich der ddNTPs führt und deren Einbau während der PCR-Reaktion ermöglicht, wodurch es zum Strangabbruch kommt. Es entstehen dadurch eine Vielzahl unterschiedlich langer DNA-Fragmente mit spezifischen ddNTP am 3'-Ende, die über eine Gelkapillare im ABI Prism 310 Genetic Analyzer aufgetrennt, detektiert und der Basenabfolge zugeordnet werden können. Durch eine zweite Mutation im aminoterminalen Ende der Polymerase ist außerdem die 5'→3'-Nuklease-Aktivität eliminiert.

Für jede Sequenzierungsreaktion wird ein Reaktionsmix aus 4 µl Ready-Mix (AmpliAq, ddNTP), 4 µl Primer (0,8 pmol/µl), 3 µl DNA (0,2 µg/µl) und 9 µl dH₂O hergestellt.

PCR-Programm:

Temperatur	Zeit	
96°C	30 sec	25 Zyklen
x °C	15 sec	
60°C	4 min	

Das PCR-Produkt wurde mit 20 µl dH₂O versetzt und anschließend in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß mit vorgelegten 4 µl 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) und 100 µl abs. Ethanol überführt. Nach Inkubation für 10 min im Eisbad und anschließender Zentrifugation bei 14.500 x g, 30 min wird der Überstand mit einer Glaskapillare entfernt, das DNA-Pellet mit 250 µl 70%igem Ethanol gewaschen und bei 14.500 x g, 15 min rezentrifugiert. Der Überstand wird erneut mit einer Glaskapillare entfernt, das Pellet bei 37°C im Inkubator getrocknet und anschließend in 12,5 µl Template-Suppression Reagent (PE Applied Biosystems) resuspendiert. Nach Inkubation bei 95°C, 2 min wird die Probe im Eisbad abgekühlt, rezentrifugiert und in ein ABI-Probengefäß überführt. Anschließend kann die DNA-Probe mit dem ABI Prism 310 Genetic Analyzer sequenziert werden.

2.3 Arbeit mit Bakterien

2.3.1 Bakterien-Stämme

E.coli SURE (Stop Unwanted Rearrangement Events), (Greener, 1990): recB, recJ, sbcC201, uvrC, umuC: Tn5(kan^R), mcrA, mcrB, mrr lac, Δ (hsdRMS), endA1, gyrA96, thi, supE44 [F', proAB, lacIqZ Δ M15 FN10 (tet^R)], Tetracyclin-resistent

DH5α: F⁻ φ80dlacZDM15, Δ(lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(r_K⁻, m_K⁺), gal, phoA, supE44, I, thi-1, gyrA96, relA1

2.3.2 Kulturmedien und Lösungen

LB-Medium: 10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Bacto-Hefeextrakt; 5 g/l NaCl

SOB-Medium: 20 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Bacto-Hefeextrakt; 0,58 g/l NaCl (10 mM); 0,19 g/l KCl (2,5 mM); 2,03 g/l MgCl₂·6H₂O (10 mM); 1,2 g/l MgSO₄ (10 mM)

SOC-Medium: 3,6 g/l Glucose (20 mM) in SOB-Medium

Ampicillin: 50 mg/ml in 70%igem Ethanol (Na-Salz)

Kanamycin: 50 mg/ml in H₂O

Tetracyclin: 50 mg/ml in 70%igem Ethanol

2.3.3 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Von einer Agarplatte mit E.coli SURE bzw. DH5 α wird mit einer Impföse eine einzelne Bakterienkolonie gepickt und in 2 ml LB-Medium überführt. Anschließend wird die angeimpfte Bakterienkultur über Nacht unter Schütteln (180 rpm) bei 37°C inkubiert. Von der gesättigten Übernachtskultur werden 800 μ l in einen 2l-Kolben mit Schikanen, gefüllt mit 800 ml LB-Medium und 3,2 ml Tetracyclin-Lösung gegeben. Die Bakterien werden bei 37°C unter Schütteln (180 rpm) inkubiert. Zwischenzeitlich wird von der Bakteriensuspension der O.D.-Wert bei 600 nm im Photometer bestimmt. Wird ein O.D.-Wert von ca. 0,6 erreicht, hat die exponentielle Wachstumsphase ihr Ende erreicht und die Inkubation wird beendet, indem jeweils 400 ml der Bakteriensuspension in vorgekühlte Zentrifugenbecher gegeben und 30 min auf Eis unter gelegentlichem Schwenken der Becher inkubiert werden. Anschließend können die Bakterien in einer Kühlzentrifuge mit vorgekühltem GS-3-Rotor durch 13minütige Zentrifugation bei 3500 rpm (2070 x g) bei 4°C als Pellet abgetrennt werden. Die Bakterien (Pellets) werden in insgesamt 400 ml eiskaltem, sterilem Wasser resuspendiert und anschließend ein zweites Mal 13 min bei 3500 rpm, 4°C abzentrifugiert. Die Bakterienpellets werden dann in insgesamt 400 ml eiskaltem, sterilem Wasser resuspendiert und ein drittes Mal abzentrifugiert. Das Pellet wird in 15 ml 10%igem Glycerin aufgenommen und in einen kleinen Zentrifugenbecher überführt (SS-34-Röhrchen). Die Bakterien werden dann im SS-34-Rotor 15 min bei 3500 rpm (~ 2000 x g) bei 4°C abzentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wird das nun weiße Pellet in insgesamt 2 ml Glycerin resuspendiert. Von dieser Bakterienstammlösung werden 50 μ l Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.3.4 Transformation kompetenter Zellen mittels Elektroporation

Durch ein elektrisches Feld, welches kurzfristig durch Anlegen einer hohen Spannung (mehrere 1000 V) entsteht und dessen Feldstärke dann exponentiell abnimmt, kann die Membran von Zielzellen depolarisiert werden: es entstehen Löcher in der Membran. Durch diese können die einzuschleusenden DNAs, aber auch andere Makromoleküle in das Zellinnere gelangen. Nach Regeneration der Zellmembran verfügt man dann wieder über lebensfähige Zellen, die nun die dauerhaft integrierte, neue DNA aktiv exprimieren können.

Es werden 50 μ l kompetente Zellsuspension auf Eis aufgetaut und mit 1 μ l Probe, z.B. Ligationsansatz, versetzt und mit der Pipettenspitze gemischt. Nach einer Minute Inkubation auf Eis wird der Transformationsansatz in eine Transformationsküvette mit 0,2 cm Elektrodenabstand gegeben und in der Gen-Pulser-Apparatur einem elektrischen Feld (2,5 kV, 25 μ F, 200 Ω) ausgesetzt. Die Impulsdauer sollte bei 4 bis 5 msec liegen. Sofort nach Transformation werden die Zellen in 1 ml 37°C warmes SOC-Medium gegeben und für 1 Stunde bei 37°C unter Schütteln (180 rpm) inkubiert. In Aliquots wird die Zellsuspension auf LB-Agarplatten, die entsprechend dem Selektionsmarker ein Antibiotikum tragen, ausplattiert. Im Brutschrank oder -raum bei 37°C werden die Zellen über Nacht inkubiert, bis auf den Platten sichtbar abgetrennte Zellkolonien entstehen.

2.3.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli - Klare Lysate

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgt in Anlehnung an das Protokoll von Birnboim und Doly, 1979. Bei dieser Methode wird kein Ultrazentrifugationsschritt benötigt. Außerdem ist sie im Vergleich zur bekannten Triton-Lysozym-Methode weniger zeitaufwendig. Der Nachteil ist jedoch, dass im Endprodukt geringe Verunreinigungen von chromosomaler E.coli-DNA und RNA auftreten, was die präzise Quantifizierung der Plasmid-DNA durch Messung des O.D.-Wertes erschweren kann.

Zellsuspensionspuffer: 50 mM Glucose; 25 mM Tris/HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; optional 20 mg/ml Lysozym

Denaturierungslösung: 0,2 M NaOH; 1% (w/v) SDS

Es werden von einer Agarplatte Einzelkolonien des transformierten E.coli gepickt und diese in 2 ml LB-Medium über Nacht bei 37°C auf einem Kulturrüttler (180 rpm) inkubiert. Die Zellen werden bei 10.000 x g, RT, 1 min abzentrifugiert und anschließend mit 200 µl Zellsuspensionspuffer versetzt. Nach Vortexen wird die Zellsuspension für 5 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 400 µl der Denaturierungslösung und folgender Inkubation der Zellen für 5 min auf Eis werden die Zellen lysiert, SDS denaturiert Proteine, NaOH denaturiert chromosomale und Plasmid-DNA (Basenpaar-/Strangtrennung), die Lösung klärt auf. Die Proteine werden durch Zugabe von 300 µl 7,5 M Ammoniumacetat-Lösung und anschließender Inkubation für 10 min auf Eis gefällt (Bildung eines Ammonium-SDS-Protein-Komplexes) und durch Zentrifugation bei 15.000 x g, RT, 15 min abgetrennt. Da chromosomale DNA an den Proteinen der Membranen haftet, wird diese ebenfalls abgetrennt. Der Überstand, der die denaturierten Plasmide enthält, wird mit 0,6 bis 1,0 ml Isopropanol versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert, es kommt zur Ausfällung der Plasmid-DNA. Durch Zentrifugation bei 15.000 x g, RT, 15 min wird die DNA sedimentiert. Diese wird mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen, bei 37°C getrocknet und schließlich in 50 bis 100 µl TE-Puffer gelöst.

Da mit der Plasmid-DNA auch etwas RNA ausfällt, muss diese durch Verdau mit RNase A (1 mg/ml) beseitigt werden. Durch Restriktionsenzyme kann die DNA geschnitten und anschließend auf einem Agarose-Gel analysiert werden.

2.3.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli mit dem JETSTAR-System[®]

Die Präparation von Plasmiden kann mit dem JETSTAR-System der Firma GENOMED (Kat. Nr. 310040) durchgeführt werden.

Suspensionspuffer : 50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase

Lysispuffer: 200 mM NaOH; 1% (w/v) SDS

**Neutralisations-
lösung:** 3,2 M Kaliumacetat in Essigsäure, pH 5,5

**Equilibrierungs-
lösung:** 600 mM NaCl; 100 mM Natriumacetat/Essigsäure, pH 5,0; 0,15 % Triton-X 100

Waschpuffer: 800 mM NaCl; 100 mM Natriumacetat/Essigsäure, pH 5,0

Elutionspuffer: 1250 mM NaCl; 100 mM Tris/HCl, pH 8,5

Es werden von einer Agarplatte Einzelkolonien des transformierten E.coli gepickt und diese in 2 ml LB-Medium + Selektionsantibiotikum (Minipräparation) bzw. in 20 ml LB-Medium + Selektionsantibiotikum (Midipräparation) bzw. in 200 ml LB-Medium + Selektionsantibiotikum (Maxipräparation) über Nacht bei 37°C auf einem Kulturrüttler (180 rpm) inkubiert. Am nächsten Tag werden die Bakterien der Zellsuspension bei 6000 x g, 4°C, 15 min abzentrifugiert. Das Pellet wird in 0,4/4/10 ml Suspensionspuffer resuspendiert und anschließend mit 0,4/4/10 ml Lysispuffer versetzt, vorsichtig geschüttelt (5mal Schwenken)

und 5 min bei RT inkubiert. Mit 0,4/4/10 ml Neutralisationslösung wird die Zellsuspension neutralisiert (5mal Schwenken) und die bakteriellen Bestandteile durch Zentrifugation bei 20.000 x g, 20°C, 15 min abgetrennt. Der Überstand, der die DNA enthält, wird auf eine mit 2/10/30 ml Equilibrierungslösung behandelten Säule gegeben. Die Säule wird mit 2 x 2,5/2 x 10/1 x 60 ml Waschpuffer gewaschen und die gebundene DNA mit 0,9/5/15 ml Elutionspuffer anschließend eluiert. Die DNA wird mit 0,63/3,5/10,5 ml Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation bei 20.000 x g, 4°C, 30 min abgetrennt. Das Pellet wird mit 1/2/5 ml 70%igem Ethanol gewaschen (Rezentrifugation bei 20.000 x g, 4°C, 30 min) und anschließend bei RT oder 37°C getrocknet. Die DNA wird in 20/200/500 µl TE-Puffer aufgenommen und die DNA-Konzentration durch O.D.-Messung bestimmt ($\text{O.D.}_{260\text{ nm}} \times 50 \times \text{Verdünnung}/1000 = \mu\text{g}/\mu\text{l}$).

2.4 Arbeit mit eukaryotischen Zellen

2.4.1 Zelllinien

C3H10T^{1/2}:	Diploide Fibroblasten-Zelllinie, aus einer C3H-Mausembryo-Zelllinie isoliert (Reznikoff, C.A. et al., 1973a,b), ATCC, Kat. Nr.: CCL-226
C3H10T^{1/2}_{BMP2}:	C3H10T ^{1/2} -Zelllinie, rekombinant BMP2 exprimierend (Ahrens, M. et al., 1993), Puromycin resistent
HEK293T:	Humane embryonale Nierenzellen, transformiert mit gescherter Adenovirus Serotyp 5 DNA, E1-exprimierend (Graham, FL., 2002); zusätzliche Expression vom großen SV40 T-Antigen (293tsA1609neo, ATCC, Kat. Nr.: CRL-11268)
HEK293LP:	Humane embryonale Nierenzellen, transformiert mit gescherter Adenovirus Serotyp 5 DNA, E1-expremierend (Graham, FL., 2002); Verwendung in niedriger Passage (HEK293 low passage, Microbix, Kat. Nr.: PD-02-01)
A549:	Hypotriploide humane Zelllinie isoliert aus Lungentumorgewebe (Giard, D.J. et al., 1973 und Lieber, M., et al., 1976), ATCC, Kat. Nr.: CCL-185

2.4.2 Kulturmedien und Lösungen

DMEM: (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium)	13,47 g/l DMEM-Pulver (Sigma, D-7777); 3,75 g/l (45 mM) NaHCO ₃ ; 2,383 g/l (10 mM) HEPES; pH 7,2
MEM: (Minimum Essential Medium)	9,53 g/l MEM-Pulver (Gibco, 61 100-087); 0,85 g/l (10 mM) NaHCO ₃ ; 2,383 g/l (10 mM) HEPES; pH 7,2
Pen/Strep-Lösung: (100fach)	6,06 g/l Ampicillin; 10 g/l Streptomycin

Glutamin-Lösung: (100fach)	29,24 g/l (200 mM) Glutamin
PBS: (phosphate buffered saline)	8 g/l (140 mM) NaCl; 0,2 g/l (27 mM) KCl; 1,15 g/l (7,2 mM) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,2 g/l (14,7 mM) KH_2PO_4
TEP:	10 ml Trypsin-Lösung (5 g Trypsin (1:250)/l; 2 g EDTA/l in PBS); 90 ml PBS
Puromycin-Lösung:	2,5 mg/ml Puromycin
G418-Lösung:	100 mg/ml Geneticin® (G-418 Sulfat)
FCS: (fötales Kälber-serum)	Das FCS (Gibco, 10270-106) wird vor dem Gebrauch für 45 min bei 56°C inkubiert, um Komplementfaktoren zu deaktivieren.
DMEM⁺⁺/10% FCS	88% (v/v) DMEM; 1% (v/v) Pen/Strep-Lösung (100fach); 1% (v/v) Glutamin-Lösung (100fach); 10% (v/v) FCS
DMEM⁺⁺/10% FCS/ Puromycin	5 µg/ml Puromycin-Lösung (2,5 mg/ml) in DMEM ⁺⁺
DMEM⁺⁺/10% FCS/ G418	0,75 mg/ml G418-Lösung (100 mg/ml) in DMEM ⁺⁺
DMEM⁺⁺/10% FCS/ Puromycin/G418	5 µg/ml Puromycin-Lösung (2,5 mg/ml); 0,75 mg/ml G418-Lösung (100 mg/ml) in DMEM ⁺⁺
DMEM⁺⁺/FCS-frei	98% (v/v) DMEM; 1% (v/v) Pen/Strep-Lösung (100fach); 1% (v/v) Glutamin-Lösung (100fach)
DMEM⁺⁺/20% FCS	78% (v/v) DMEM; 1% (v/v) Pen/Strep-Lösung (100fach); 1% (v/v) Glutamin-Lösung (100fach); 20% (v/v) FCS
MEM⁺⁺/10% FCS	88% (v/v) MEM; 1% (v/v) Pen/Strep-Lösung (100fach); 1% (v/v) Glutamin-Lösung (100fach); 10% (v/v) FCS
MEM⁺⁺/5% FCS	93% (v/v) MEM; 1% (v/v) Pen/Strep-Lösung (100fach); 1% (v/v) Glutamin-Lösung (100fach); 5% (v/v) FCS

Für die Kinetik der Zelldifferenzierung wird ein modifiziertes Medium eingesetzt, welches das für die Differenzierung wichtige Natriumascorbat (Stock-Lösung 5000 µg/ml) sowie β-Glycerolphosphat (Stock-Lösung 1 M) enthält. Natriumascorbat stimuliert die Kollagensynthese (Jeffrey und Martin, 1966), β-Glycerolphosphat als zusätzliche organische Phosphatquelle fördert die Mineralisierung (Owen et al., 1990) und erhöht die Alkalische Phosphatase-Aktivität in osteoblastoiden Zellen (Quarles et al., 1992).

DMEM^{++D}/10% FCS/ G418	0.75 mg/ml G418-Lösung (100 mg/ml); 1% (v/v) Natriumascorbat (50 µg/ml); 1% (v/v) β-Glycerolphosphat (10 mM) in DMEM ⁺⁺
DMEM^{++D}/10% FCS/ Puromycin/G418	5 µg/ml Puromycin-Lösung (2,5 mg/ml); 0,75 mg/ml G418-Lösung (100 mg/ml); 1% (v/v) Natriumascorbat (50 µg/ml); 1% (v/v) β-Glycerolphosphat (10 mM) in DMEM ⁺⁺

Die Medien werden bei 4°C, die Lösungen und FCS bei -20°C gelagert.

2.4.3 Kulturbedingungen

Die Zellen werden in Kulturflaschen oder Mehrlochplatten mit Wachstumsmedium bei 37°C, 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Alle 2 bis 3 Tage wird das Medium gewechselt.

C3H10T½	DMEM ⁺⁺ /10% FCS
C3H10T½ + Expressionsplasmid	DMEM ⁺⁺ /10% FCS/G418
C3H10T½ /BMP2	DMEM ⁺⁺ /10% FCS/Puromycin
C3H10T½ /BMP2 + Expressionsplasmid	DMEM ⁺⁺ /10% FCS/Puromycin/G418
HEK293T	DMEM ⁺⁺ /10% FCS
HEK293LP	MEM ⁺⁺ /10% FCS
A549	DMEM ⁺⁺ /10% FCS

2.4.4 Beschichtung von kleinen Flaschen mit PDL (Poly-D-Lysin)

Durch Beschichtung der Flaschen mit PDL wird ein besseres Haften der Zellen auf dem Flaschenboden gewährleistet. Das PDL wird auf 0,1 mg/ml verdünnt. 1,5 ml von dieser Suspension werden pro kleiner Flasche auf dem Boden verteilt, dabei muss darauf geachtet werden, dass der komplette Flaschenboden benetzt ist. Nach 10minütiger Inkubation wird das PDL entfernt und 3mal mit mindestens 2 ml sterilem Wasser gewaschen. Anschließend können die Zellen direkt ausgesät werden oder die Flaschen werden unter der Cleanbench getrocknet.

2.4.5 Passagieren von Zellen

Nach Waschen der Zellen mit warmem PBS werden diese mit TEP überschichtet und für wenige Minuten inkubiert. Durch leichtes Klopfen können die Zellen vom Boden gelöst werden. Die Zellsuspension wird zur Deaktivierung des Trypsins mit mindestens der doppelten Menge Medium versetzt und resuspendiert. Nach Einstellung einer Verdünnung mit Medium kann die Zellsuspension in Aliquots auf andere Kulturgefäße überführt werden.

2.4.6 Einfrieren von Zellen

Nachdem die Zellen in einer mittleren Flasche bis fast zur Konfluenz gewachsen sind, werden diese mit PBS gewaschen und anschließend abtrypsiniert (siehe Kapitel 2.4.5). In geeigneten Röhrchen werden die Zellen dann bei 1000 rpm, 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet in 5 ml 95% FCS/5% DMSO resuspendiert. In Aliquots von 1 ml wird die Zellsuspension auf Kryo-Röhrchen verteilt und 24 Stunden bei -70°C eingefroren. Danach werden die Zellen in flüssigem Stickstoff endgelagert.

2.4.7 Auftauen von Zellen

Die im flüssigen Stickstoff gelagerten Zellen werden zunächst für ca. 1 h bei -70°C aufbewahrt, um den flüssigen Stickstoff langsam entweichen zu lassen. Danach werden die Zellen so schnell wie möglich aufgetaut und sofort mit entsprechendem Medium auf einer

mittleren Flasche ausgesät. Nach Anwachsen der Zellen (ca. 2 Stunden nach Auftauen) sollte zur Entfernung des DMSO bereits der erste Mediumwechsel erfolgen.

2.4.8 Fixieren von Zellen

Die Zellen einer kleinen Flasche werden nach Absaugen des Mediums mit 5 ml PBS gewaschen und anschließend für 30 min bei 4°C mit 5 ml 3%igem Paraformaldehyd in PBS (PFA) inkubiert. Nach dem dreimaligen Waschen der Zellen mit PBS werden diese in PBS bei 4°C bis zu den histologischen Färbungen gelagert.

2.4.9 Stabile Transfektion von DNA

Zum Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen mit dem Ziel einer stabilen Integration dieser DNA in das Wirtsgenom kann man sich einer Vielzahl unterschiedlicher Transfektionssysteme bedienen. Bei der hier gewählten Methode wird das Ziel-Gen entweder mit einem Selektionsplasmid für Antibiotikaresistenz im Konzentrationsverhältnis 1:8 zusammen eingesetzt (Co-Transfektion) oder aber das Ziel-Gen selbst liegt in einem Selektionsplasmid. Im ersten Fall wird das Selektionsplasmid ebenfalls in das Wirtsgenom integriert und ermöglicht den Zellen, in Medium mit Antibiotikum zu wachsen, während die nicht mit dem Selektionsplasmid transfizierten Zellen absterben, auch wenn sie das Ziel-Gen aufgenommen haben. Da die Möglichkeit besteht, dass das Selektionsplasmid auch ohne Ziel-Gen in die Zellen transfiziert, müssen nach Transfektion und Selektion die sich bildenden Zellkolonien einzeln isoliert und anschließend genetisch untersucht werden (siehe Kapitel 2.1.1, 2.4.12, 2.4.14).

Bei der Transfektion von C3H10T $\frac{1}{2}$ - und C3H10T $\frac{1}{2}$ _{BMP2}-Zellen mit pcDNA3 oder Ziel-Genen, die in diesen Vektor kloniert wurden, werden keine Selektionsplasmide benötigt, da dieser Vektor bereits eine Neomycin-Resistenz (G418-Resistenz) trägt.

2.4.10 Transfektion mit DOSPER (Boehringer Mannheim)

DOSPER, chemische Bezeichnung 1,3-Di-Oleoyloxy-2-(6-Carboxy-spermyl)-propylamid, C₅₈H₁₁₃O₁₃N₅, ist ein Transfektionsreagenz für die kationische Liposomenvermittelte Transfektion von DNA in eukaryotische Zellen (Lipofektion). Es interagiert wie alle kationischen Liposomen spontan mit DNA unter Bildung von Liposomen/Polynukleotid-Komplexen, wobei die positiv geladenen Spermin-Kopfgruppen von DOSPER die negativ geladenen DNA-Moleküle binden. Der gebildete Komplex wird unspezifisch von der mit negativen Ladungen überzogenen Oberfläche der zu transfizierenden Zellen absorbiert. Anschließend kommt es zur DNA-Aufnahme.

Vor der Transfektion werden die Zellen für 2 Stunden mit frischem Medium inkubiert. Es wird ein Transfektionsansatz aus zu transfizierender DNA und Selektionsplasmid in 62,5 µl HBS-Puffer mit einer Endkonzentration der zu transfizierenden DNA von ca. 20 µg/ml und einer Endkonzentration des Selektionsplasmids von 2 µg/ml sowie eine DOSPER-Verdünnung in 62,5 µl HBS mit der Endkonzentration 160 µg DOSPER/ml hergestellt. Transfektionsansatz und DOSPER-Verdünnung werden vorsichtig vermischt und für 15 min bei RT inkubiert, um die Bildung des DOSPER/DNA-Komplexes zu ermöglichen. Vom Mix (125 µl) werden 75 µl mit 1 ml FCS-freiem Medium versetzt und auf die mit FCS-freiem Medium gewaschenen Zellen gegeben. Die Zellen werden dann für 6 Stunden bei 37°C, 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert und anschließend mit 1 ml DMEM⁺⁺/20% FCS versetzt. Nach 24 Stunden Inkubation erfolgt der erste Mediumwechsel mit Selektionsmedium.

2.4.11 Transiente Transfektion mit FuGENE™ 6 (Roche)

Nicht immer ist eine stabile Transfektion für die Analyse von Proteinen erforderlich. In solchen Fällen bietet sich eine transiente Transfektion in HEK293T-Zellen an. Dabei können eine oder mehrere DNAs ohne Selektionsdruck in die Zellen eingebracht und exprimiert werden.

Vor der Transfektion werden die Zellen auf mittlere Petrischalen ausgesät und bis zu einer Dichte von maximal 80% inkubiert. Zur Transfektion wird pro Ansatz 100 µl FCS-freies Medium in eine sterile 24-well-Platte vorgelegt, mit 8 µl FuGENE™ 6 tropfenweise versetzt und durch Resuspension gemischt. Nach 5 min Inkubation bei RT wird dieser FuGENE-Mediummix tropfenweise zur jeweiligen DNA (max. 4 µg; evtl. DNA-Mix) gegeben und durch Resuspension gemischt. Nach weiteren 15 min Inkubation bei RT wird der FuGENE-Medium-DNA-Mix tropfenweise über die vorbereiteten HEK293T-Zellen verteilt. Die Zellen werden dann für ca. 2 Tage bei 37°C, 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert und anschließend durch Abspülen geerntet. Durch Zentrifugation bei 450 x g, 4°C, 5 min werden die Zellen pelletiert, der Überstand wird gründlich entfernt, das Pellet in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung (siehe Kapitel 2.5.2 und 2.5.3) bei -70°C gelagert.

2.4.12 Isolierung von RNA und Proteinen

Für die Isolierung der gesamten RNA oder für die gleichzeitige Isolierung der RNA, der DNA und von Proteinen aus Zellen wird TRIZOL-Reagent® LS (GIBCO) eingesetzt. Dieses Reagenz basiert auf der Single-Step RNA-Isolationsmethode (Chomczynski und Sacchi, 1987), bei der Guanidinthiocyanat und Phenol für die Lysierung der Zellen und gleichzeitigen Inaktivierung endogener RNAsen zum Einsatz kommen.

UpperTris: 0,5 M Tris; 0,4% (w/v) SDS; pH 6,7

Urea-Puffer: 4,2042 Harnstoff; 645 µl upperTris; 4 ml 1%ige SDS-Lösung;
0,1788 g DTT; 320 µl 0,25 M EDTA; 1865 µl dH₂O

Die Zellen werden in kleinen Flaschen kultiviert. Zum gewünschten Zeitpunkt werden die Zellen nach Absaugen des Mediums mit 1 ml TRI-Reagent® LS für mindestens 5 min inkubiert. Das Lysat wird in ein Eppendorfgefäß überführt und kann bei -70°C gelagert werden.

Zur Abtrennung der RNA von Proteinen und DNA wird das Lysat mit 133 µl 1-Brom-3-Chlorpropan (BCP) versetzt, 15 sec geschüttelt und für 15 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation bei 18.000 x g, 4°C, 15 min entstehen 2 Phasen, eine wässrige Phase, die die RNA enthält, und eine organische Phase (phenolhaltig) mit Proteinen. In der Interphase befindet sich die genomische DNA der Zellen.

Die obere RNA-haltige Phase wird in 200 µl-Schritten abgetrennt und mit der 0,6- bis einfachen Menge an Isopropanol versetzt. Die Probe wird dann für 40 min bei -70°C inkubiert und anschließend bei 20.000 x g, 4°C, 20 min zentrifugiert. Das Isopropanol wird abgesaugt und die RNA in 500 µl 70%igem Ethanol resuspendiert. Nach Zentrifugation bei 20.000 x g, RT, 5 min wird das Ethanol abgesaugt, das Pellet bei RT getrocknet, in 20 µl zweifach autoklaviertem, 0,1%igem DEPC (Diethylpyrocarbonat)-behandeltem Wasser aufgenommen und für 10 min bei 58°C inkubiert. Die RNA kann dann bei -70°C gelagert werden. In 1:50 bis 1:100 Verdünnung wird bei 260 nm die RNA-Konzentration bestimmt ($\text{O.D.}_{260 \text{ nm}} \cdot x$ (Verdünnung) $\cdot 37 = \text{RNA } \mu\text{g/ml}$). Anschließend kann die mRNA als Bestandteil der gesamten RNA durch reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden (siehe Kapitel 2.4.14).

Die untere proteinhaltige Phase wird mit 400 µl Ethanol versetzt und 3 min bei RT inkubiert. Nach Abzentrifugation der DNA bei 2000 x g, 4°C, 5 min wird der Überstand, der die Proteine enthält, in 200 µl Aliquots abgenommen, mit 2 ml Isopropanol versetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Die Proteine werden bei 12.000 x g, 4°C, 10 min abzentrifugiert und anschließend mit 2 ml 0,3 M Guanidinium-HCl in 95%igem Ethanol für 20 min bei RT gewaschen. Nach Rezentrifugation bei 7500 x g, 5 min, 4°C wird der Waschvorgang noch zweimal mit Guanidinium-HCl in 95%igem Ethanol und einmal mit Ethanol wiederholt. Das Proteinpellet wird dann kurz bei RT getrocknet, in 50 µl Urea-Puffer resuspendiert und 1 h bei 37°C auf einem Inkubator unter Schütteln gelöst. Die Konzentration der Proteinlösungen kann nach der Methode von Bradford bestimmt werden, die auf der Grundlage der Bindung von Coomassie Brilliant Blue an Proteine beruht. Dazu wird eine Eichreihe verschiedener BSA-Konzentrationen in Färbelösung (20 mg CBB G 250; 11,7 ml Ethanol; 26,95 ml H₃PO₄; 250 ml dH₂O; gefiltert) bei Messung der Extinktion bei 595 nm aufgenommen. In gleicher Weise werden die Proteinlösungen vermessen. Anhand der Eichgeraden kann anschließend die Konzentration dieser Proben bestimmt werden (1 ml Färbelsg., 50 µl Probe/Std/PBS).

Die isolierten Proteine können über SDS-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 2.4.21) aufgetrennt, im Westernblot auf PVDF-Membran transferiert (siehe Kapitel 2.4.23) und letztlich über Immunmarkierung charakterisiert werden (siehe Kapitel 2.4.24).

2.4.13 Isolierung von Proteinen

Lysepuffer: 20 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 1% (w/v) NP-40; 50 mM NaF; 1 mM Na₄P₂O₇; (+ 1 Inhibitortablette und pro 10 ml Lösung)

Die Zellen werden in kleinen Flaschen kultiviert. Zum gewünschten Zeitpunkt werden die Zellen nach Absaugen des Mediums mit 750 µl Lysepuffer für mindestens 10 min inkubiert und das Lysat anschließend 10 min bei 20.800 x g zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen (75 µl davon als Aliquot) und kann bei -70°C gelagert werden.

Die Konzentrationsbestimmung der Proteine und die weitere Verwendung in SDS-Gelelektrophorese etc. erfolgt in Übereinstimmung mit den Ausführungen in Kapitel 2.4.12.

2.4.14 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese aus RNA erfolgt nach der modifizierten Methode von Gubler und Hoffman (1983). Der Anteil von mRNA an der gesamten zellulären RNA beträgt ca. 1 - 2%. Diese wird selektiv durch Einsatz von Oligo-(dT)-Primern, die an die 3'-PolyA-Enden der mRNA binden, durch reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben.

Es werden 5 µg der gesamten RNA mit DEPC-Wasser versetzt, so dass das Endvolumen 11,6 µl beträgt. Nach Zugabe von 1 µl Oligo-(dT)₁₂₋₁₈-Primern (0,5 µg/µl, GIBCO®, Kat.-Nr. 18418-012) wird die RNA bei 70°C für 10 min denaturiert und anschließend für 2 min auf Eis inkubiert. Dann werden 4 µl 5fach RT-Puffer (GIBCO®, Kat.-Nr. Y00146), 2 µl 0,1 M DTT (GIBCO®, Kat.-Nr. Y00146), 1 µl dNTP (je 10 mM) und 0,4 µl RNasin® (RNase-Inhibitor, 40 U/µl; Promega, Kat.-Nr. N2111) zum Ansatz gegeben und dieser 2 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 1 µl reverse Transkriptase M-MLV (200 U/µl; GIBCO®, Kat.-Nr. 28025-013) wird die reverse Transkription bei 37°C, 60 min gestartet. Anschließend wird die Probe mit 30 µl TE-Puffer versetzt und 5 min bei 90°C zur Inaktivierung der reversen Transkriptase inkubiert.

2.4.15 Kinetik der Zelldifferenzierung

Um die Auswirkung eines transfizierten Gens in Zellen bezüglich des Differenzierungsverhaltens nach Erreichen der Konfluenz beurteilen zu können, werden an definierten Tagen vor und nach Erreichen der Konfluenz RNA und Proteine isoliert und Zellen mit PFA fixiert, um diese später histologisch anfärben zu können.

Es soll für jeden gewünschten Zeitpunkt der Kinetik eine kleine Flasche für RNA/Protein-Isolierung, eine kleine Flasche für Proteinisolierung und eine kleine Flasche für Zellfixierung zur Verfügung stehen. Entsprechend der Anzahl der Untersuchungszeitpunkte werden die Zellen zum selben Zeitpunkt auf eine entsprechende Zahl von kleinen Flaschen ausgesät, pro Flasche sind dies $12,5 - 18,75 \cdot 10^4$ Zellen, entsprechend $5 - 7,5 \cdot 10^3$ Zellen/cm², so dass die Zellen in allen Flaschen zur selben Zeit die Konfluenz (Tag 0 der Differenzierung) erreichen. Ab Tag 0 wird statt dem normalen Selektionsmedium ein Differenzierungsmedium mit Ascorbat und β -Glycerophosphat beim Mediumwechsel verwendet.

An den vorher festgelegten Zeitpunkten wird dann eine Flasche für die RNA/Protein-Isolierung (siehe Kapitel 2.4.12), eine für die Proteinisolierung (siehe Kapitel 2.4.13) und eine Flasche für die Zell-Fixierung (siehe Kapitel 2.4.8) verwendet.

2.4.16 Dokumentation der Morphologie

Mit einer Digitalkamera werden die C3H10T^{1/2}- und C3H10T^{1/2}_{BMP2}-Zellen an verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung in der Vergrößerung 1:40 aufgenommen und mit Adobe Photoshop 5.0 bearbeitet.

2.4.17 Histologische Färbungen

Die mit PFA fixierten Zellen können durch verschiedene Färbetechniken auf ihre Differenzierungsrichtung untersucht werden. Alkalische Phosphatase ist ein Osteoblastentypischer Marker, und mit Alcian-Blau werden hyperthrophe Chondrozyten, spezifisch das in Knorpel vorkommende saure, sulfatreiche Proteoglykan, angefärbt.

NBT/BCIB: SigmaFast™ Nitro Blue Tetrazolium/5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate Ready-to-use Tablette in 10 ml dH₂O (Sigma, Kat. Nr. 127H8200)

Alcian-Blau: 0,5% (w/v) Alcian-Blue 8GS (Roth, Kat. Nr. 3032) in 1 N HCl, filtriert (alternativ: 0,5% (w/v) Alcian-Blue 8GX (Sigma, Kat. Nr. A 3157) in 0,1 N HCl, filtriert)

2.4.17.1 Alkalische Phosphatase-Färbung

Die fixierten Zellen werden mit NBT/BCIB bei RT für 1 h unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wird die Farbreaktion durch mehrmaliges Waschen der Zellen mit Wasser abgestoppt und die Zellen eingedeckelt.

2.4.17.2 Alcian-Blau-Anfärbung der Zellen

Die fixierten Zellen werden mit dH₂O gewaschen, anschließend mit Alcian-Blau Färbelösung überschichtet und bei RT ÜN unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wird der Farbstoffüberschuss durch mehrmaliges Waschen der Zellen mit Wasser entfernt und die Zellen eingedeckelt.

2.4.18 Immunologische Färbungen

PBT: PBS; 0,1% TritonX-100

Blockierungspuffer: PBT; 5% FCS

Verdünnungslösung (für Antikörper): PBT; 2% FCS; 1% BSA

Die Immunologischen Färbungen dienen der Kontrolle der korrekten Expression und Lokalisation von Zielproteinen in den Zellen. Dabei kann es sich sowohl um endogene als auch um überexprimierte Proteine handeln.

Die Zellen werden auf PDL-beschichteten Glas-Objektträgern ausgesät und prä-konfluent fixiert. Abweichend zum im Kapitel 2.4.8 beschriebenen Fixierungsprotokoll wird hierbei eine 4%ige Paraformaldehyd-Lösung direkt zum Medium gegeben, nach 3-minütigem Einwirken der Überstand komplett entfernt und erneut für 8 min mit 4%igem Paraformaldehyd überschichtet. Nach dem dreimaligen Waschen der Zellen mit PBS werden die Zellen permeabilisiert.

Zur Permeabilisierung werden die Zellen für 5 min in -20°C kaltem Methanol und anschließend 5 min in PBT/0,5% Tx-100 inkubiert, bevor sie zweimal für 3 min in PBT gewaschen werden. Zur Absättigung freier Bindungsstellen werden die permeabilisierten Zellen für 60 min mit Blockierungspuffer inkubiert und erneut mit PBT gewaschen.

Die eigentliche immunologische Färbung erfolgt über die Bindung Farbstoff-markierter Antikörper direkt oder über weitere Antikörper an die Zielproteine. Hierzu werden die Zellen vergleichbar mit der Vorgehensweise in Kapitel 2.4.24 mit einer Verdünnung des 1. Antikörpers über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend mit PBT gewaschen. Es folgt eine einstündige Inkubation mit einer Verdünnung des 2. Antikörpers (Farbstoff-markiert) im Dunkeln und erneutes Waschen mit PBT. Zusätzlich können die Zellen noch für 10 min mit einer DAPI-Lösung (zwecks DNA-Färbung) behandelt und noch einmal mit PBT gewaschen werden, bevor sie eingedeckelt werden.

2.4.19 Eindeckeln der angefärbten Zellen

Die Zellen werden mit Kaiser's Glyceringelatine (Merck, Kat. Nr. 840295341) eingedeckelt. Dazu werden 15 μl bei 60°C verflüssigte Glyceringelatine auf die Zellen getropft und mit einem Deckgläschen luftblasenfrei bedeckt. Die Deckglasumrandung kann mit handelsüblichem farblosem Nagellack verschlossen werden.

2.4.20 Dokumentation der angefärbten Zellen

Die fixierten und eingedeckelten C3H10T $\frac{1}{2}$ - und C3H10T $\frac{1}{2}$ _{BMP2}-Zellen werden mit einer Digitalkamera an verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung in der Vergrößerung 1:40 aufgenommen und mit Adobe Photoshop 5.0 bearbeitet.

2.4.21 SDS-Gelelektrophorese

PAA:	30% (w/v) Polyacrylamid; 0,8 % (w/v) Bisacrylamid in H ₂ O (Rotiphorese Gel 30, Roth)
SDS (10%):	10% (w/v) Natriumdodecylsulfat
Laufpuffer (8fach):	1,85 M Tris; 0,67 M Glycin; 8% (w/v) SDS (10%); 16 mM EDTA; pH 8,8
APS:	40% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat in H ₂ O
lowerTris:	1,5 M Tris; 0,4% (w/v) SDS; pH 8,8
upperTris:	0,5 M Tris; 0,4% (w/v) SDS; pH 6,7
4xProbenpuffer: (reduzierend)	2,581 ml upperTris; 0,516 g SDS; 7 ml Glycerin (87%); 0,1788 g DTT, auf 10 ml Endvolumen mit H ₂ O auffüllen, mit Bromphenolblau versetzen
Trenngel (7.5%):	2,5 ml PAA; 2,5 ml lower Tris; 4,9 ml H ₂ O; 8 µl TEMED; 12 µl APS
Trenngel (12.5%):	4,1 ml PAA; 2,5 ml lower Tris; 3,2 ml H ₂ O; 8 µl TEMED; 12 µl APS
Sammelgel:	0,7 ml PAA; 2,0 ml upper Tris; 4,2 ml H ₂ O; 10 µl TEMED; 16 µl APS
Größenmarker:	Multicolored Protein Markers, Wide Range (New England BioLabs® Inc. NEL 311)

Nach Aufbau der Gelkassette (Geldicke 1 mm) mit Abdichtgummi wird das Trenngel in die Kammer gegeben (ca. 4/5 voll) und dieses mit ein wenig Wasser überschichtet, so dass eine glatte Oberfläche entsteht. Das APS initiiert die Acrylamidpolymerisation, TEMED ist der Katalysator für diese Reaktion. Nach Polymerisation des Trenngels (ca. 1 h) wird das Wasser abgegossen. Die Kassette wird anschließend bis zum oberen Rand mit Sammelgel-Lösung gefüllt und der Kamm eingesetzt. Nach Polymerisation des Sammelgels (ca. 1 h) kann das Abdichtgummi der Gelkammer entfernt und die Gel-Kassette in den mit Laufpuffer (1fach) gefüllten Puffertank eingesetzt werden. Vor Auftragen der Proben in die Slots wird der Kamm unter Puffer aus der Gelkassette genommen.

Die Proteine sind entweder in Urea-Puffer mit Bromphenol-Blau (siehe Kapitel 2.4.12) oder in einer nicht denaturierenden Flüssigkeit (Puffer, H₂O) gelöst. In diesem Fall werden die Proben noch mit 4x Probenpuffer versetzt. Vor Auftrag der Proben werden diese 2 min bei 50°C (Urea-PP) oder 5 min bei 95°C inkubiert, die Längenmarker 2 min bei 95°C. Nach Auftragen der Proben und der Längenmarker wird am Gel eine Spannung von 75 V, später von 150 V angelegt. Erreicht der Frontmarker den unteren Rand des Gels, wird die Elektrophorese beendet und das Gel vorsichtig aus der Gel-Kassette entnommen. Die Proteine können mit Coomassie Brilliant Blue (siehe Kapitel 2.4.22) angefärbt oder mittels Westernblot auf eine PVDF-Membran transferiert werden (siehe Kapitel 2.4.23).

2.4.22 Anfärbung der Proteine im Gel durch Coomassie Brilliant Blue (CBB)

CBB-Färbelösung: 1 g CBB-G250 in 200 ml dH₂O bzw. 1 g CBB-R250 in 200 ml Methanol; 40 ml Eisessig; filtriert

Entfärbelösung: 75,5% (v/v) dH₂O, 5,7% (v/v) Eisessig, 18,8% (v/v) Methanol

Das SDS-Gel wird für eine Stunde mit CBB-Färbelösung unter Schütteln inkubiert und anschließend mit Entfärbelösung so lange entfärbt, bis nur noch Proteinbanden blau gefärbt sind.

2.4.23 Westernblot

Beim Westernblot werden Proteine von einem Gel der SDS-Gelelektrophorese auf eine PVDF-Membran (Millipore[®], 0,45 µm, Kat.-Nr.: IPVH00010) übertragen, so dass sie anschließend immunmarkiert werden können.

Blotpuffer: 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20% (v/v) Methanol

Im Biometra Tank Blot wird für 180 min eine Stromstärke von ca. 0,7 A und eine Spannung von 110 V an die Gele angelegt, wobei der Pluspol auf Seiten der PVDF-Membran, der Minuspol auf Seiten des Gels anzuschließen ist (Transfer von (-) zu (+)). Die transferierten Proteine können jetzt immunmarkiert werden.

2.4.24 Immunmarkierung

TBS: 0,08% (w/v) NaCl; 0,002% KCl; 5 mM Tris-HCl; pH 7,4

TTBS: 0,1% (w/v) Tween20[®] in TBS

Blockpuffer: Entrahmte H-Milch (0,3% Fett)

Blockpuffer (alternativ): 5% BSA (w/v) in TTBS

Substratlösung: Chemiluminescence Blotting Substrat POD (Boehringer Mannheim, Kat.-Nr.: 1500708)

Immunmarkierung von Ror2 (Flag-Tagging):

- 1. Antikörper:** Anti-Flag[®] M2: monoklonaler IgG-Antikörper (Maus); Ca-unabhängig;
Binding site: N-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-C
(SIGMA, Product No. F3165)
- 2. Antikörper:** Peroxidase-konjugierter AffiniPure GαM-IgG-Antikörper (Ziege);
erkennt schwere und leichte Kette eines IgG-Antikörpers (Maus)
(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.; Kat.-Nr.: 115-035-003)

Immunmarkierung von interagierenden Proteinen (HA-Tagging):

- 1. Antikörper:** HA-probe (Y-11): polyklonaler IgG-Antikörper (Kaninchen)
(SantaCruz Biotechnology, Inc.; Kat.-Nr.: sc-805)
- 2. Antikörper:** Peroxidase-konjugierter AffiniPure GαR-IgG-Antikörper (Ziege);
erkennt schwere und leichte Kette eines IgG-Antikörpers
(Kaninchen)
(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.; Kat.-Nr.: 111-035-003)

Immunmarkierung von interagierenden Proteinen (Myc-Tagging):

- 1. Antikörper:** c-Myc (9E10): monoklonaler IgG-Antikörper (Maus)
(SantaCruz Biotechnology, Inc.; Kat.-Nr.: sc-40)
- 2. Antikörper:** Peroxidase-konjugierter AffiniPure GαM-IgG-Antikörper, Fc_χ
Fragment-spezifisch (Ziege); erkennt nur die schwere Kette eines
IgG-Antikörpers (Maus)
(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.; Kat.-Nr.: 111-035-008)

Immunmarkierung von interagierenden Proteinen (TAK1):

- 1. Antikörper:** Tak1 (M-579): polyklonaler IgG-Antikörper (Kaninchen)
(SantaCruz Biotechnology, Inc.; Kat.-Nr.: sc-7162)
- 2. Antikörper:** Peroxidase-konjugierter AffiniPure GαR-IgG-Antikörper (Ziege);
erkennt schwere und leichte Kette eines IgG-Antikörpers
(Kaninchen)
(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.; Kat.-Nr.: 111-035-003)

Immunmarkierung von endogenen Kinasen (p38, JNK, ERK):

- 1. Antikörper (p38):** p38 MAP-Kinase: AffiniPure polyklonaler IgG-Antikörper
(Kaninchen); erkennt spezifisch p38
(Cell Signaling Technology®; Kat.-Nr.: 9212)
- 1. Antikörper (JNK):** SAPK/JNK: AffiniPure polyklonaler IgG-Antikörper (Kaninchen);
erkennt spezifisch p54 und p46
(Cell Signaling Technology®; Kat.-Nr.: 9252)
- 1. Antikörper (ERK):** p44/42 MAP-Kinase: AffiniPure polyklonaler IgG-Antikörper
(Kaninchen); erkennt spezifisch p44 und p42
(Cell Signaling Technology®; Kat.-Nr.: 9102)
- 2. Antikörper:** Peroxidase-konjugierter AffiniPure GαR-IgG-Antikörper (Ziege);
erkennt schwere und leichte Kette eines IgG-Antikörpers
(Kaninchen)
(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.; Kat.-Nr.: 111-035-003)

Immunmarkierung von phosphorylierten endogenen Kinasen (p38, JNK, ERK):

- 1. Antikörper (p38):** Phospho-p38 MAP-Kinase: AffiniPure polyklonaler IgG-Antikörper (Kaninchen); erkennt spezifisch doppelt-phosphoryliertes p38 (Thr180/Tyr182) (Cell Signaling Technology®; Kat.-Nr.: 9211)
- 1. Antikörper (JNK):** Phospho-SAPK/JNK: AffiniPure polyklonaler IgG-Antikörper (Kaninchen); erkennt spezifisch doppelt-phosphoryliertes p54 und p46 (Thr183/Tyr185) (Cell Signaling Technology®; Kat.-Nr.: 9251)
- 1. Antikörper (ERK):** Phospho-p44/42 MAP-Kinase: AffiniPure polyklonaler IgG-Antikörper (Kaninchen); erkennt spezifisch doppelt-phosphoryliertes p44 und p42 (Thr202/Tyr204) (Cell Signaling Technology®; Kat.-Nr.: 9101)
- 2. Antikörper:** Peroxidase-konjugierter AffiniPure GαR-IgG-Antikörper (Ziege); erkennt schwere und leichte Kette eines IgG-Antikörpers (Kaninchen) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.; Kat.-Nr.: 111-035-003)

Immunmarkierung von BMP2:

- 1. Antikörper:** Anti-human BMP-2: monoklonaler IgG-Antikörper (Maus) (R&D Systems; Kat.-Nr.: MAB3551)
- 2. Antikörper:** Peroxidase-konjugierter AffiniPure GαM-IgG-Antikörper (Ziege); erkennt schwere und leichte Kette eines IgG-Antikörpers (Maus) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.; Kat.-Nr.: 115-035-003)

Immunmarkierung von b-Gal:

- 1. Antikörper:** Anti-β-Galactosidase: monoklonaler IgG-Antikörper (Maus) (Promega; Kat.-Nr.: Z3783)
- 2. Antikörper:** Peroxidase-konjugierter AffiniPure GαM-IgG-Antikörper (Ziege); erkennt schwere und leichte Kette eines IgG-Antikörpers (Maus) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.; Kat.-Nr.: 115-035-003)

Die PVDF-Membran (Millipore®) mit transferierten Proteinen wird 1 h bei RT unter langsamen Schwenken mit Milch (0,3% Fett) inkubiert. Dabei werden unspezifische Bindungsstellen für Antikörper abgesättigt. Der 1. Antikörper in Milch (alternativ ist die Benutzung von BSA-Lösung möglich) wird über Nacht bei 4°C unter langsamen Schwenken auf die Membran gegeben. Anschließend wird die Membran 3mal 10 min mit TTBS gewaschen, bevor für 1 h die Membran mit dem 2. Antikörper in Blockpuffer unter langsamen Schwenken inkubiert wird. Die Membran wird daraufhin 3mal mit TTBS gewaschen. Durch Zugabe der Substratlösung wird die durch das an den 2. Antikörpers gekoppelte Enzym, z.B. Peroxidase, katalysierte Reaktion gestartet. Es kommt durch Oxidation des Chemilumineszenz-Substrates zu einer länger anhaltenden Lichtemission, die auf Röntgenfilm erfasst werden kann (Exposition: 5 sec bis 90 min).

2.5 Methoden zur Untersuchung von Interaktionen zwischen Proteinen

2.5.1 Yeast Two-Hybrid-System

Das Yeast Two-Hybrid System (2H-System) bietet die Möglichkeit, Interaktionen zwischen verschiedenen Proteinen *in vivo* zu untersuchen.

Viele eukaryotische Transkriptionsfaktoren sind aus zwei unabhängigen Domänen, der DNA-bindenden Domäne (BD) und der Aktivierungsdomäne (AD), aufgebaut. Im 2H-System sind diese Domänen getrennt und an zu untersuchende Proteine gekoppelt. Diese Hybrid-Proteine sind allein jedoch transkriptionell inaktiv. Die DNA-bindende Domäne kann zwar an eine spezifische Promotor-Sequenz binden, aber erst durch eine Interaktion der zu untersuchenden Proteine kommt es zur Assoziation mit der Aktivierungsdomäne, was dann zu einer Initiierung der Transkription führt. Über Reporter-Gene, die dadurch angeschaltet werden, lässt sich die Interaktion nachweisen (Abbildung 10).

Das von der Firma CLONTECH Laboratories, Inc. entwickelte MATCHMAKER Two-Hybrid System 3 (Kat. Nr. K1612-1) basiert auf dem Hefe-Transkriptionsfaktor *GAL4*, dessen DNA-bindende Domäne an die Promotor-Sequenz UAS (upstream activating sequence) von *Gall* binden kann, an welche die für den Nachweis einer Interaktion bzw. zur Selektionierung erforderlichen Reportergene *lacZ*, *HIS3* oder *ADE2* gekoppelt sind. Das *lacZ*-Gen codiert eine β -Galactosidase, das *HIS3*-Gen erlaubt das Wachstum der Hefe auf Histidin-freiem Medium, das *ADE2*-Gen erlaubt das Wachstum der Hefe auf Adenosin-freiem Medium.

Für eine Untersuchung der Interaktion von Proteinen werden die gewünschten Proteine als Fusionsproteine mit korrektem Leseraster mit der GAL4-DNA-bindenden Domäne des Vektors pGBKT7 (BD) bzw. mit der GAL4-transaktivierenden Domäne des Vektors pACT2 (AD) hergestellt und anschließend zusammen in einen Hefestamm transformiert. Die Hefen, die beide Plasmide tragen und in denen eine Interaktionen der beiden Proteine stattfindet, werden durch Wachstum auf Mangelmedium (-Trp, -Leu, -His) selektiert, da durch den BD-Vektor der Tryptophanmangel (*TRP1*), durch den AD-Vektor der Leucinmangel (*LEU2*) und durch die Interaktion der Histidinmangel (*Gall-HIS3*-Gen) kompensiert wird. Nach Aufschluss der Zellen mittels flüssigem Stickstoff kann die Interaktion der beiden Proteine durch β -Galactosidase-Aktivität (*Gall-lacZ*-Gen) direkt nachgewiesen werden. Dieses Enzym bewirkt durch die Umsetzung von X-Gal als zugesetztem Substrat eine Blaufärbung der Hefekolonien. Wird zusätzlich auf einem anderen Mangelmedium (-Trp, -Leu, -His, -Ade) selektioniert, zeichnen sich die Hefen, die keine interagierenden Fusionsproteine enthalten, durch eine deutliche Rotfärbung aus.

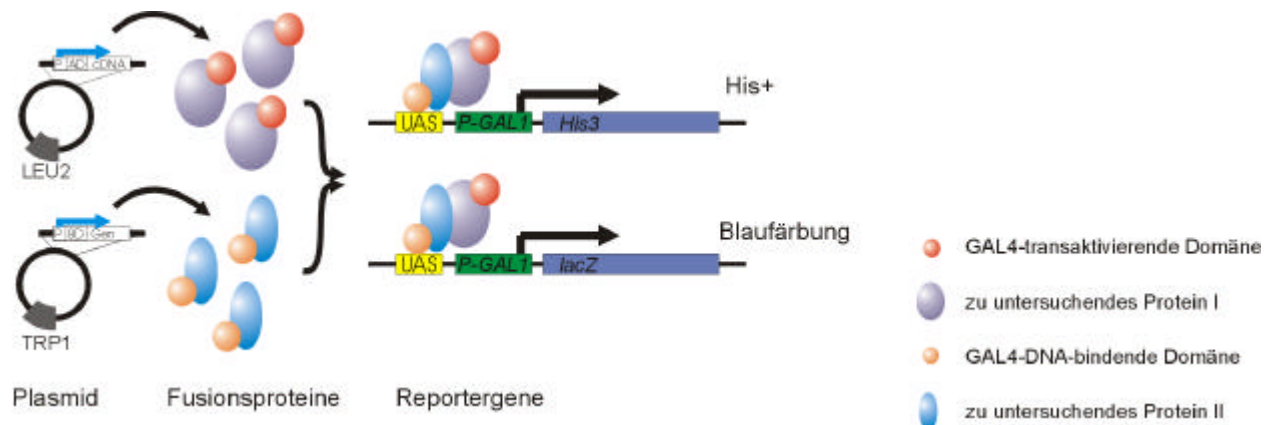


Abbildung 10: MATCHMAKER Two-Hybrid System 3

Die Fusion von zwei Proteinen mit der DNA-bindenden bzw. der transaktivierenden Domäne von GAL4 ermöglicht es, die physische Interaktion dieser beiden Proteine im Hefezellkern anhand der Expression von spezifischen Markergenen nachzuweisen (His+, Blaufärbung).

2.5.1.1 Hefestamm (*Saccharomyces cerevisiae*)

AH109: *MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4D, gal80D, LYS2::GAL1_{UAS}GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{AUS}.GAL2_{TATA}-ADE2, ura3::MEL1_{UAS}.MEL1_{TATA}-lacZ*

2.5.1.2 Transformation von BD-Vektoren in Hefezellen

Die Hefen AH109 werden in 50 ml warmem YPAD-Medium (10g Hefeextrakt; 20g Peptone 20 g Glucose; 100 mg Adeninhamisulfat in 1 l dH₂O) bis zu einer Zellzahl von $2 \cdot 10^7$ Zellen/ml = $1 \cdot 10^9$ Zellen/50ml herangezuehtet, abzentrifugiert, mit 25 ml H₂O gewaschen und in 1 ml 100 mM Lithiumacetat resuspendiert ($1 \cdot 10^9$ Zellen/ml) und bei 30°C 15 min inkubiert. Anschließend werden 100 µl dieser Hefezellsuspension mit 10 µl DNA aus Heringssperma (Transporter für BD-Vektor, 20 min bei 95°C denaturiert), 100 ng BD-Vektor und 600 µl PEG/Lithiumacetat (40% (w/v) Polyethylenglycol (3350 D); 0,1 M Lithiumacetat) in dH₂O versetzt, gevortext und 30 min bei 30°C, 800 rpm inkubiert. Dann werden die Zellen 15 min bei 42°C erhitzt, abgekuehlt, rezentrifugiert, in 500 µl dH₂O aufgenommen und auf SD-Mangelmedium (-Trp, -His, -Ura) selektioniert. Die Zellen koennen dann auf ihre Faeigkeit, die Histidin-, Adenosin- und β-Galactosidase-Reportergene zu autoaktivieren, untersucht werden.

2.5.1.3 Aminotriazol-Test

Dieser Test dient zur Bestimmung der erforderlichen 3-Amino-1,2,4-triazol-Konzentration (3-AT), unter der bei Histidin-Mangel ein Wachstum der mit BD-Vektor transformierten Hefen nicht mehr moeglich ist. 3-AT ist ein kompetitiver Inhibitor des HIS3-Proteins, eines Enzyms der Histidin-Biosynthese. Da die untransfizierten Hefestaemmen dieses Protein in geringem Umfang exprimieren ("leaky promoter"), kann durch Zugabe von 3-AT ein Wachstum der Hefen auf dem Mangelmedium voellstaendig unterbunden und damit eine Autoaktivierung des His-Reportergens untersucht werden.

2.5.1.4 b-Galactosidase-Assay : Nachweis von Protein-Protein-Interaktion

Z-Puffer: 16,1 g/l Na₂HPO₄·7H₂O; 5,5 g/l NaH₂PO₄·H₂O; 0,75 g/l KCl; 0,246 g/l MgSO₄; pH 7,0

X-Gal-Lösung: 20 g/l X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid) in DMF (N,N-Dimethylformamid)

Färbelösung: 100 ml Z-Puffer; 0,27 ml β-Mercapthoethanol; 5 ml X-Gal-Lösung

Auf eine mit Hefekolonien bewachsene SD-Agarplatte wird ein steriler NC-filter (Porablot NCL, Macherey-Nagel, Kat.-Nr. 741293) gelegt. Nach voellstaendiger Befeuchtung wird dieser mit den daran haftenden Hefezellen in fluessigem Stickstoff für 10 bis 15 sec inkubiert, was die Zellen aufschlieft, und nach Auftauen luftblasenfrei auf ein mit Faebelösung getraenktes Whatmann-3MM-Papier gelegt. Hefekolonien, die interagierende Proteine produzieren, faerben sich nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bis mehreren Stunden blau.

2.5.1.5 Transformation der AD-Vektoren in Hefezellen mit BD-Plasmid

Die mit BD-Vektor transformierten Hefezellen, die keine β -Galactosidase-Autoaktivität zeigen, werden in SD-Medium (-Trp) über Nacht bei 30°C, 150 rpm herangezüchtet. Nach Zellzählung werden $2,5 \cdot 10^9$ Zellen abzentrifugiert und in 500 ml YPAD-Medium resuspendiert ($5 \cdot 10^6$ Zellen/ml). Diese Zellen werden bis zu einer Zellzahl von $2 \cdot 10^7$ Zellen/ml bei 30°C, 150 rpm inkubiert, dann abzentrifugiert, mit 250 ml dH₂O gewaschen und in 5 ml Lithiumacetat aufgenommen. Die Zellsuspension wird dann mit 500 μ l DNA aus Heringssperma, 71,5 μ l der bereits vorhandenen cDNA-Library (random geprimt aus C3H10T $\frac{1}{2}$ BMP2-Zellen; $1,3 \cdot 10^6$ cfu/ μ g Plasmid-DNA), 428,5 μ l dH₂O und 30 ml PEG/Lithiumacetat versetzt, gevortext und 30 min bei 30°C, 150 rpm inkubiert. Dann werden die Zellen 30 bis 35 min bei 42°C erhitzt, abgekühlt, rezentrifugiert und in 500 ml YPAD-Medium resuspendiert. Nach 1 h Inkubation bei 30°C, 270 rpm werden die Zellen in 5,5 ml dH₂O mit 3-AT aufgenommen und in 200 μ l Aliquots auf 145 cm²-Agar-Platten (-Trp, -Leu, -His) ausgestrichen. Zur Beurteilung der Effizienz der Transformation werden von der Zellsuspension Verdünnungen von 1:100 und 1:1000 auf 55 cm² Agar-Platten ausgestrichen. Nach Inkubation bei 30°C können Hefeklonen von den 145 cm²-Platten für Untersuchung der AD-Plasmide isoliert und von den 55 cm²-Platten für die Bestimmung der Transformations-effizienz ausgezählt werden.

2.5.1.6 Untersuchung der AD-Plasmide

Die auf 145 cm²-Agar-Platten gewachsenen Hefeklonen werden auf zwei unterschiedlichen Masterplatten (-Trp, -Leu, -His bzw. -Trp, -Leu, -His, -Ade) mit 3-AT ausgestrichen und bei 30°C inkubiert. Anschließend können über einen β -Galactosidase-Assay Klone verifiziert werden, die auch für das zweite und dritte Reportergen eine Protein-Protein-Wechselwirkung (Blaufärbung/keine Rotfärbung) zeigen. Für die Identifizierung der Interaktionspartner muss die über Random-Priming in den AD-Vektor klonierte DNA amplifiziert, aufgereinigt, sequenziert und anschließend analysiert werden. Dazu werden die Hefen auf eine 96-Loch-Platte mit 25 μ l Lysis-Puffer (50 mM Tris, pH 7,5; 10 mM EDTA; 0,3% (v/v) β -Mercapthoethanol; 0,2% (v/v) β -Glucuronidase) pro Loch überführt und für 3,5 h bei 37°C, 180 rpm inkubiert. Nach enzymatischer Lyse werden die Zellwände durch Zugabe von Glasperlen und Schütteln zusätzlich mechanisch lysiert. Nach Zugabe von 100 μ l dH₂O pro Loch werden 2 μ l der lysierten Zellsuspension in einen Ansatz aus 14,8 μ l dH₂O, 2 μ l 10fach PCR-Puffer, 1 μ l MgCl₂-Lösung (50 mM), 0,4 μ l dNTPs (10 mM), 1,6 μ l AD-Primer-Mix (5 μ M) und 0,4 μ l Taq-Polymerase gegeben und in einer PCR die Inserts der AD-Vektoren amplifiziert.

PCR-Reaktion:

Temperatur	Zeit	
94°C	10 min	
96°C	30 sec	
50 °C	30 sec	35 Zyklen
72°C	1,5 min	
72°C	10 min	

Die PCR-Produkte werden über ein 1%-LMP-Gel (TAE-Puffer lowEDTA) aufgetrennt, aus dem Gel eluiert und sequenziert (siehe Kapitel 2.1.3, 2.1.4.2, 2.2). Die vom ABI Prism 310 Genetic Analyzer generierten Basensequenzen werden mit Sequenzen aus Datenbanken im Internet (Blast-Search) verglichen und erlauben eine Identifizierung der putativen Interaktionspartner zwischen dem bekannten Protein aus dem BD-Vektor und dem unbekannten Proteinfragment aus dem AD-Vektor.

2.5.1.7 Verifizierung der positiven Klone

Die bezüglich eines Wachstums auf Mangelmedium (-His/-Ade) und der Blaufärbung im β -Galactosidase-Assay als positiv bzw. der Rotfärbung auf Mangelmedium (-Ade) als negativ eingestuften Hefeklone müssen von falsch positiven Hefeklonen unterschieden werden. Dazu werden die aus der Blast-Search hervorgegangenen putativen Interaktionspartner in geeignete Expressionsvektoren kloniert und mittels Co-IP (siehe Kapitel 2.5.2) verifiziert.

2.5.2 Co-Immunpräzipitation (Co-IP)

Lysepuffer: 20 mM Tris, pH 7,5; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 1% (w/v) NP-40; 50 mM NaF; 1 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$; (+ 1 Inhibitortablette und 10 μl 100 μM Okadaic Acid pro 10 ml Lösung)

SDS-PP (SDS-Probenpuffer): 2,581 ml upperTris (siehe Kapitel 2.4.19); 0,516 g SDS; 0,1788 g DTT; 7 ml 87% Glycerin; etwas BPB (Bromphenolblau) zur Färbung; bei 56°C lösen

Die Co-IP stellt eine weitere Methode zur Untersuchung von Interaktionen zwischen verschiedenen Proteinen *in vivo* dar.

Hierzu werden HEK293T-Zellen mit der DNA der zu untersuchenden Interaktionspartner transient transfiziert (siehe Kapitel 2.4.11). Die tiefgefrorenen Zellpellets werden auf Eis mit 200 μl Lysepuffer versetzt und durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Anschließend wird die Suspension bei 20.800 x g, 4°C für 10 min zentrifugiert und das Pellet verworfen. Vom Überstand werden 10 μl zu 50 μl SDS-PP gegeben und dienen später der Beurteilung der Gesamtexpression der Proteine in den HEK293T-Zellen. Mit den restlichen ca. 200 μl wird die IP-Reaktion durchgeführt:

Der Überstand wird mit einem Antikörper, der gegen eines der beiden potentiell interagierenden Proteine gerichtet ist, versetzt und 2 h bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert (sollte in den Zellen eine Interaktion zwischen den Proteinen stattgefunden haben, würde der Antikörper folglich nicht allein an das Zielprotein binden, sondern an den intrazellulär gebildeten Komplex). Nach Zusatz von 25 μl Protein G-Sepharose-Suspension wird erneut 1 h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert (über den Antikörper würden die Komplexe an die Protein G-Sepharose-Kügelchen gebunden). Die Sepharose-Kügelchen werden bei 420 x g, 4°C für 2 min abzentrifugiert und anschließend mit 500 μl Lysepuffer gründlich gewaschen (zusammen mit den Kügelchen dann natürlich auch die daran gebundenen Proteine). Diese Waschprozedur wird sechsmal wiederholt. Nach dem siebten Waschschrift werden die Kügelchen mit gel loader tips trockengesaugt, mit 20 μl SDS-PP versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Die isolierten Proteine können über SDS-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 2.4.21) aufgetrennt, im Westernblot auf PVDF-Membranen transferiert (siehe Kapitel 2.4.23) und letztlich über Immunmarkierung charakterisiert werden (siehe Kapitel 2.4.24). Vor dem Auftragen der Proteine auf das SDS-Gel müssen die Proben 5 min bei 95°C denaturieren, um die Proteine von den Sepharose-Kügelchen abzulösen.

2.5.3 Luciferase-Assay

Lysepuffer: 100 mM K₃PO₄ pH 7,8; 0,2% (w/v) Triton X-100; 0,5 mM DTT

Substratlsg. (β-Galactosidase): Clontech S0917

Substratlsg. (Luciferase): Promega E151A

Der Einfluss von Proteinen auf Signalwege und damit verbunden auf die Transkription diverser Zielgene kann unter anderem über sogenannte Reporter-Gen-Assays bestimmt werden. Weit verbreitet sind in diesem Zusammenhang die Luciferase-Assays, bei denen Plasmide mit Luciferase-Gen unter der Kontrolle von unterschiedlichen Promotoren verwendet werden. Der Aufbau dieser Promotor-Sequenzen hängt dabei entscheidend von dem zu untersuchenden Signalweg und den dadurch beeinflussten Transkriptionsfaktoren ab (Abbildung 11).

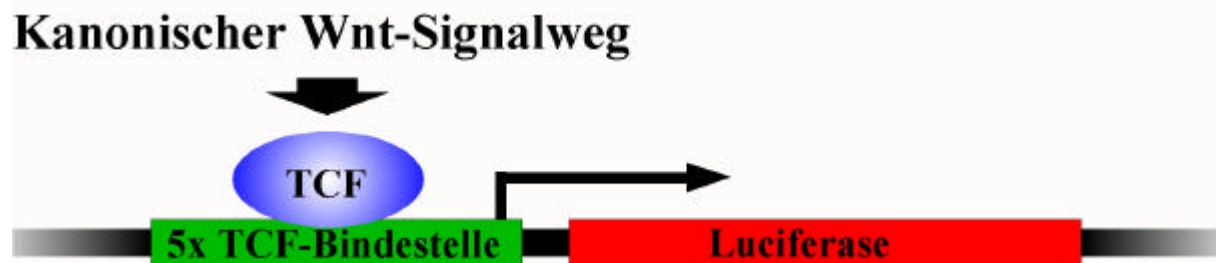


Abbildung 11: Schematische Darstellung eines Luciferase-Assays

Beispielhaft dargestellt ist die Verwendung des TOP-Flash-Plasmids, d.h. die Expression der Luciferase wird in diesem Fall durch die Aktivität des Transkriptionsfaktors TCF reguliert, wodurch sich dieses System für die Untersuchung der kanonischen Wnt-Signalwege eignet.

In 24-Loch-Platten werden die Zellen sowohl mit dem promotor-regulierten Luciferase-tragenden Plasmid als auch mit einem konstitutiv β-Galactosidase-exprimierenden Plasmid (dient dem Abgleich der Proben) und der zu untersuchenden DNA transient transfiziert (siehe Kapitel 2.4.11). Nach ca. 30 Stunden wird das Medium von den Zellen vorsichtig entfernt und die Zellen werden pro Loch mit 500 µl PBS gewaschen. Auch das PBS wird vollständig entfernt und die Zellen werden in den 24-Loch-Platten bei –70°C eingefroren und bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die tiefgefrorenen Zellen werden auf Eis aufgetaut, mit 200 µl Lysepuffer versetzt und durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Anschließend wird das Lysat in eine 96-Loch-Platte mit Rundboden transferiert. Je 7,5 µl dieser Lysate werden für die Auswertung im Luminometer in einander entsprechende Löcher zweier weißer 96-Loch-Platten mit flachem Boden überführt (eine Platte für die β-Galactosidase-Messung, eine Platte für die Luciferase-Messung).

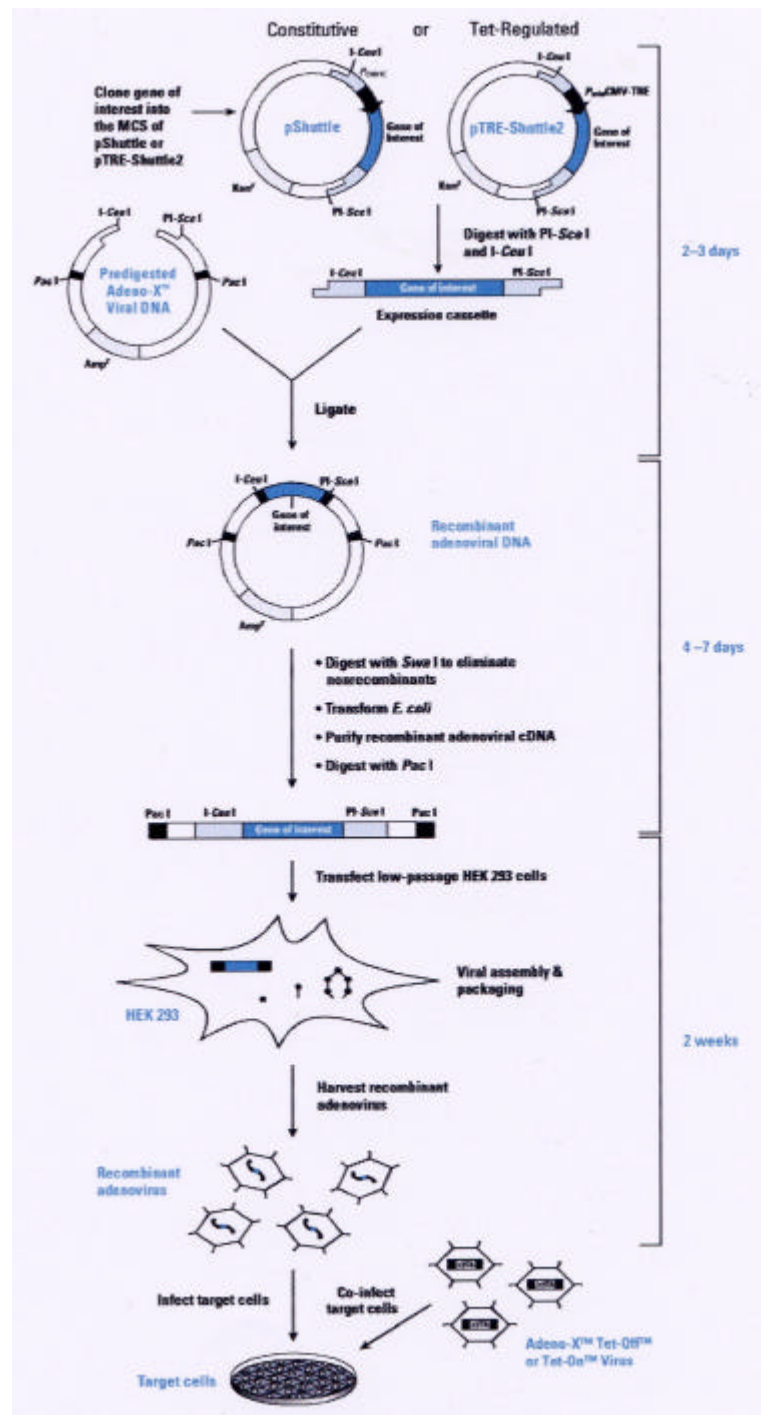
Für die β-Galactosidase-Messung werden die Lysate mit jeweils 25 µl β-Galactosidase-Substratlösung versetzt, bei RT für mind. 30 min im Dunkeln inkubiert und anschließend im Luminometer vermessen.

Für die Luciferase-Messung werden die Lysate in der zweiten Platte mit 25 µl Luciferase-Substratlösung versetzt und sofort vermessen.

2.6 Arbeit mit Adenovirus

Adenoviren besitzen ein lineares doppelsträngiges DNA-Genom. Gut untersuchte und häufig angewandte Adenoviren zur Untersuchung von eukaryotischer Genexpression und Regulation sind die beiden humanen Adenoviren Serotyp 5 (Ad5) und 2 (Ad2).

2.6.1 Herstellung von Adenovirus mit dem Adeno-X™ Adenoviral Expression System



Die Herstellung von rekombinanten Adenoviren mit dem Adeno-X-Expression System umfasst folgende Schritte:

- Zunächst wird das Zielgen in die multiple cloning site des pShuttle-Vektors kloniert
- Anschließend wird die Expressionskassette mit den beiden Enzymen I-CeuI und PI-SceI herausgeschnitten und *in vitro* in die linearisierte Adeno-X DNA ligiert
- ein zusätzlicher Verdau mit dem Enzym SmaI linearisiert eventuell vorhandene, nicht-rekombinante, adenovirale DNA
- als nächstes wird die rekombinante DNA in kompetente E. coli (DH5α) – Bakterien transformiert
- das rekombinante Plasmid wird aufgereinigt und mit dem Enzym PacI verdaut
- nun werden HEK293LP-Zellen mit der adenoviralen DNA transfiziert. Die virale DNA wird von den Zellen vermehrt, verpackt und freigesetzt
- nach einigen Tagen wird der Virus geerntet
- die Viren können beliebig vermehrt und zur Infektion diverser Zielzellen eingesetzt werden

Abbildung 12: Übersicht über die Herstellung von Adenovirus

Mit der Expressionskassette aus pShuttle wird das Zielgen in den Adeno-X-Vektor kloniert. Ein PacI-Verdau linearisiert die virale DNA, bevor sie in HEK-Zellen transfiziert, vermehrt, verpackt und als rekombinanter Adenovirus freigesetzt werden kann. Der rekombinante Adenovirus kann anschließend beliebig vermehrt, aufgereinigt und zur Infektion von Zielzellen eingesetzt werden.

2.6.1.1 Klonierung von Zielgenen in pShuttle

Zur Klonierung von Zielgenen in den pShuttle-Vektor wurden die im Kapitel 2.1 zusammengefassten Methoden verwendet.

2.6.1.2 Klonierung der Expressionskassette in Adeno-X DNA

Für den PI-SceI/I-Ceu-Verdau werden 2 µl pShuttle-Plasmid-DNA (0,5 g/l), 3 µl 10x BSA, 3 µl 10x-Double Digestion buffer, 2 µl PI-SceI (1 U/µl) und 0,5 µl I-CeuI mit 19,5 µl H₂O versetzt. Der Reaktionsansatz wird für 3 h bei 37° C inkubiert. Anschließend werden zur Fällung der DNA 70 µl TE, pH 8,0 und 100 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1 hinzugefügt, alles gründlich gevortext und für 5 min bei 20.000 x g und 4°C abzentrifugiert. Die Oberphase wird in ein neues Gefäß überführt und mit 400 µl 95% EtOH, 25 µl 10 M Natriumacetat und 1 µl Glycogen versetzt (20 mg/ml). Nach erneutem vortexen und zentrifugieren wird der Überstand entfernt und das Pellet an der Luft getrocknet. Zum Schluss wird das Pellet in 10 µl TE, pH 8,0 gelöst und bei -20°C gelagert.

Die Ligation in den Adeno-X-Vektor findet weitgehend entsprechend der im Kapitel 2.1.8 beschriebenen Vorgehensweise statt. Zu beachten sind lediglich das Verhältnis von PI-SceI/I-CeuI-verdauter pShuttle-Plasmid-DNA (s.o., 2 µl) zum vorverdauten Adeno-X-Vektor (250 ng/µl, 3 µl) und eine Temperatur von 16°C. Phenolisierung und Fällung der DNA erfolgen nach den oben erwähnten Schritten, das Pellet wird in 15 µl H₂O gelöst.

Die ligierte DNA wird einem SwaI-Verdau unterzogen, um nicht-rekombinante Adeno-X-Vektoren zu linearisieren und somit die Anzahl an nicht-rekombinanten Klonen zu verringern. Phenolisierung und Fällung der DNA erfolgen nach den oben erwähnten Schritten, das Pellet wird in 10 µl TE, pH 8,0 gelöst.

2.6.1.3 Verdau von adenoviraler DNA mit dem Enzym PacI

Für den PacI-Verdau werden 20 µg DNA eingesetzt. Diese werden mit 16 µl NEB1+DTT (1:100), 16 µl BSA (1 g/l), 1 µl PacI Restriktionsenzym (1 U/µl). Dieser Ansatz wird mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 160 µl aufgefüllt und anschließend für 2 h bei 37°C im Thermoblock inkubiert. Phenolisierung und Fällung der DNA erfolgen nach den oben erwähnten Schritten, das Pellet wird in 10 µl TE, pH 8,0 gelöst.

2.6.1.4 Transfektion von HEK293LP-Zellen mit CaCl₂-Lösung

2x HEBS-Puffer: 5 g/l HEPES; 8 g/l NaCl; 0,37 g/l KCl; 0,125 g/l Na₂HPO₄·H₂O; 1 g/l Glucose; pH 7,1

Pro DNA-Konstrukt wird eine 75 cm²-Flasche benötigt, die zu 80-90% konfluent mit HEK293LP-Zellen bewachsen ist. Um die Transfektion erfolgreich durchzuführen, ist ein Mediumwechsel mit DMEM⁺⁺/10% FCS 4 Stunden vor Beginn der Transfektion sinnvoll, da die Zellen durch den höheren Phosphatgehalt in diesem Medium kompetenter gemacht werden und sie somit die DNA besser aufnehmen können.

Herstellung der Transfektionslösung: 1250 µl 2x HEBS-Puffer werden in ein steriles Polystyrol-Röhrchen vorgelegt. In ein weiteres Polystyrol-Röhrchen werden 2x 560 µl Wasser gegeben, mit 125 µl 2,5 M CaCl₂ versetzt und ordentlich gevortext. Anschließend werden die 20 µl DNA-Lösung (1 µg/µl) hinzutropft und vorsichtig gemischt. Der HEBS-Puffer wird auf dem Vortexer stabil geschüttelt und die DNA/CaCl₂-Lösung tropfenweise direkt auf die Oberfläche des HEBS-Puffer aufgetragen (Vorgang sollte ca. 3 - 5 min dauern). Die Lösung ist daraufhin leicht gräulich. Bei genauem Hinsehen sind die kleinen Präzipitate

als Schwebeteilchen zu erkennen. Das Präzipitat wird für 1 h abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wird die Transfektionslösung mit einer Pipette mehrmals kräftig aufgemischt und schließlich dem Medium auf den Zellen hinzugefügt. Die Suspension wird kräftig durchmischt, bevor die Zellen erneut in den Brutschrank zwischengelagert werden.

Nach 16 stündiger Inkubation erfolgt ein Mediumwechsel mit MEM⁺⁺/5% FCS. Bis zur massiven Bildung von Plaques wird das Medium alle 2-3 Tage gewechselt.

2.6.1.5 *Transiente Transfektion mit FuGENETM 6 (Roche)*

Diese Methode stellt eine Alternative zur Transfektion von HEK293LP-Zellen mit CaCl₂-Lösung dar.

Vor der Transfektion findet ein Mediumwechsel mit MEM⁺⁺/5% FCS statt.

Bei dieser Transfektion werden 200 µl FCS-freies Medium in eine 96-well-Platte vorgelegt. Als nächstes werden 40 µl FuGENETM 6 zu den 200 µl FCS-freies Medium langsam zugetropft, siebenmal mit der Pipette gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser FuGENE-Mediummix wird danach zu den 20 µl DNA zugetropft, dreimal mit der Pipette gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die gesamte Lösung wird nach Ablauf der Zeit langsam auf die Zellen getropft. Durch kreisrunde Bewegungen wird das Medium mit der Lösung vermischt.

Bis zur massiven Bildung von Plaques wird das Medium alle 2-3 Tage gewechselt.

2.6.1.6 *Ernte von Virusflaschen (FTL)*

Die Ernte der Virusflaschen erfolgt in 50 ml Greiner-Röhrchen. Zunächst wird die Flasche kräftig geschlagen, damit sich möglichst der gesamte Zellrasen von selbst ablöst. Mit Hilfe eines Zellschabers können Zellreste abgekratzt werden. Die Zellsuspension wird mit einer gestopften Pipette in ein 50 ml Greiner-Röhrchen überführt und für 8 min, bei 300 g und 4°C abzentrifugiert. Der Mediumüberstand wird in ein 15 ml Greiner-Röhrchen überführt und eingefroren, der restliche Überstand wird verworfen. Durch Zugabe von 5 ml PBS⁺⁺ (+Mg²⁺, +Ca²⁺) werden die Viren stabilisiert. Das Röhrchen wird für 30 min bei -70°C eingefroren, anschließend im Wasserbad aufgetaut und aufgeschüttelt. Diese Prozedur erhöht den Aufschluss der Zellen und somit die Freisetzung der Viren. Der Vorgang der Einfrierens und Auftauens wird zweimal wiederholt. Nach dem dritten Auftauen wird das FTL (first transfection lysate) bei -20°C gelagert. Es dient zur Herstellung von größeren Mengen an Virus und zur Reserve.

2.6.2 **Vermehrung und Analyse von Adenoviren**

2.6.2.1 *Prä-Infektion 1. Grades*

Die 5 ml FTL werden aufgetaut und aufgeschüttelt. Nach Zentrifugation bei 800 g für 10 min (4°C), werden von der Virussuspension 1 ml abgenommen und zu 4 ml 1x PBS/2% FCS, welches steril filtriert ist, gegeben, was einer 1:5 Verdünnung entspricht. Das restliche FTL wird wieder bei -20°C eingefroren. Dieser Virus/PBS-Mix wird auf eine große Roux-Flasche gegeben, welche konfluent mit HEK293LP-Zellen ist. Nach 1-2stündiger Inkubation des Virus-Gemisches (Roux-Flasche auf einen Schüttler stellen) werden 45 ml MEM⁺⁺/5% FCS-Medium hinzugegeben und die Flasche im Virusbrutschrank inkubiert.

Die Ernte der Prä-Infektion ähnelt der der FTL-Ernte (siehe Kapitel 2.6.1.6). Das Pellet wird jedoch in insgesamt 20 ml PBS⁺⁺ aufgenommen.

2.6.2.2 Prä-Infektion 2. Grades

Zur Herstellung der Prä-Infektion 2. Grades wird die Prä-Infektion 1. Grades aufgetaut und für 10 min bei 800 g (4°C) abzentrifugiert. 1 ml wird von dieser Virussuspension zu 24 ml 1x PBS/2% FCS gegeben. Davon werden 8 ml auf je 1 gelbe Roux-Flasche (konfluent mit HEK293LP-Zellen) gegeben und für 1–2 h auf dem Schüttler inkubiert. Pro DNA-Konstrukt werden drei gelbe Flaschen infiziert. Anschließend erfolgt eine Zugabe von 65 ml MEM⁺⁺/5% FCS. Die Flasche wird im Virusbrutschrank inkubiert.

Die Ernte der Prä-Infektion ähnelt der der FTL-Ernte (siehe Kapitel 2.6.1.6). Das Pellet wird jedoch in insgesamt 30 ml PBS⁺⁺ aufgenommen.

2.6.2.3 DNA-Isolierung

Pronase-Puffer: 10 mM Tris, pH 7,5; 10 mM EDTA; 0,5% SDS

Pronase-Enzym: 5 mg/ml Pronase in 10 mM Tris, pH 7,5

Pronase-Arbeitslösung: Pronase-Enzym 1:10 in Pronase-Puffer verdünnen

Zur DNA-Untersuchung werden HEK293LP-Zellen benötigt, die in einer 6-well-Platte zu ca. 80% dicht vorliegen. Es werden nach 24 h, 48 h und 72 h Proben entnommen und davon DNA-Analysen durchgeführt.

Zuerst wird eine 1:10 Virusverdünnung aus Prä-Infektion mit 1x PBS/2% FCS hergestellt (500 µl Virus + 4,5 ml 1x PBS/2% FCS). Von dieser Mischung wird 1 ml auf jedes well gegeben und für 1–2 h geschüttelt. Nach Zugabe von 4 ml MEM⁺⁺/5% FCS werden die Zellen bis zur ersten Probenentnahme im Virusbrutschrank inkubiert.

Nach 24 Stunden wird das Medium vom ersten well abgenommen und für 10 min bei 300 g (4°C) abzentrifugiert. Das Zellsediment wird in 1 ml Pronase-Arbeitslösung (900 µl Pronase-Puffer + 100 µl Pronase-Enzym) resuspendiert und über Nacht auf die Zellen gegeben. Am nächsten Tag wird das Lysat in ein 15 ml Greiner-Röhrchen überführt, das 'leere' well mit 1 ml TE (10/1) nachgespült und dem Lysat hinzugefügt. Nach Zugabe von 2 ml Phenol wird die DNA-Lösung vorsichtig gemischt und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Die gleiche Prozedur erfolgt mit der 48 h- und 72 h-Probe.

Zunächst werden die DNA-Gemische für 1 h leicht geschüttelt. Danach werden 2 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) hinzugegeben und für 15–30 min wie zuvor geschüttelt. Die Zentrifugation erfolgt für 10 min bei 2000 g (20°C). Die Überstände werden abgenommen und gesichert, die Unter- und Interphasen werden verworfen. Die eben erwähnten Schritte werden ein zweites Mal durchgeführt. Beim dritten Mal werden 2 ml Chloroform hinzugefügt, die restlichen Schritte bleiben aber gleich. Nach erneutem Sichern der Oberphasen wird das 2,5fache Volumen absolutes Ethanol (-20°C) zur Präzipitation der DNA langsam hinzupipettiert. Nach 15minütiger Zentrifugation bei 3200 g werden die Überstände verworfen und das Pellet mit 2 ml 70% EtOH (-20°C kalt) gewaschen. Es erfolgt nochmal eine Zentrifugation für 15 min bei 3500 g. Das Pellet wird bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend über Nacht in 200 µl TE gelöst.

2.6.2.4 Protein-Isolierung

Lysis-Puffer: 20 mM Tris, pH 7,5; 140 mM NaCl; 5 mM EDTA; 2% SDS

Benzonase-Enzym: Benzon Nuclease, 10.000 U/ml

Zur Protein-Analyse werden A549-Zellen benötigt, die ausgesät (80% dicht) in einer 6-well-Platte vorliegen. Es werden nach 24 h, 48 h und 72 h Proben entnommen und davon Protein-Analysen durchgeführt.

Zuerst wird eine 1:10 Virusverdünnung aus Prä-Infektion mit 1x PBS/2% FCS hergestellt (500µl Virus + 4,5 ml 1x PBS / 2% FCS). Von dieser Mischung wird 1 ml auf jedes well gegeben und für 1–2 h geschüttelt. Nach Zugabe von 4 ml MEM⁺⁺/5% FCS werden die Zellen bis zur ersten Probenentnahme im Virusbrutschrank inkubiert.

Nach 24 Stunden wird das Medium vom ersten well abgenommen und für 10 min bei 300 g abzentrifugiert. Das Zellsediment wird in 200 µl Lysispuffer + Benzonase (1:200) resuspendiert, auf die Zellen pipettiert und für 24 h inkubiert. Anschließend wird das Proteinlysate in ein Eppendorfgefäß überführt. Das 'leere' well wird mit 100 µl TE (10/0,1) bei 37°C kurz inkubiert und anschließend dem Proteinlysate hinzugefügt. Ebenso werden die 48- und 72 h-Probe behandelt.

Zum Nachweis der Proteine wird eine SDS-Page durchgeführt, wobei die Proben mit Laemli-Probenpuffer versetzt werden (siehe Kapitel 2.4.21, 2.4.23, 2.4.24).

2.6.3 Großproduktion und Aufreinigung von Adenovirus

2.6.3.1 Infektion von HEK293LP-Zellen mit Adenovirus

Für die Großproduktion von Adenovirus werden 20 gelbe Roux-Flaschen mit HEK293LP-Zellen ausgesät und bis zur Konfluenz hochgezogen. Die Prä-Infektion 2. Grades (siehe 2.6.2.2) wird aufgetaut und bei 800 g und 4° C für 10 min abzentrifugiert. 15 ml Virus werden zu 85 ml PBS/2% FCS gegeben. Von den HEK293LP-Zellen wird das Medium entfernt und die Zellen mit 20 ml der Virussuspension bedeckt. Die Lösung soll auf den Zellen für 1–2 h bei maximal 5 rpm auf dem Schüttler inkubieren. Nach Ablauf der Zeit wird der Virussuspension 60 ml MEM⁺⁺/5% FCS zugefügt. Die Zellen werden bis zur Lyse im Brutschrank inkubiert.

2.6.3.2 Ernte der infizierten HEK293LP-Zellen

Die Zellernte erfolgt meist nach 2 bis 3 Tagen, wenn ein deutlicher cytotoxischer Effekt sichtbar ist. Der restliche Zellrasen wird durch abklopfen oder schaben gelöst und die so entstandene Zellsuspension auf acht 50 ml Greiner-Röhrchen verteilt und für 10 min bei 200 g und 4°C abzentrifugiert. Anschließend werden die Überstände abdekantiert. Da in den 20 gelben Flaschen ein Gesamtvolumen von 1600 ml vorliegt, die acht 50 ml Greiner-Röhrchen aber nur 400 ml fassen, muss dieser Vorgang noch dreimal wiederholt werden. Vom dekantierten Gesamtüberstand wird eine Probe zur späteren Kontrolle bei –70°C aufbewahrt.

Zu den Zellpellets werden jeweils 5 ml 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0 hinzugegeben, sie werden resuspendiert und in ein neues Greiner-Röhrchen überführt (ml-Anzahl notieren!), wobei je vier Pellets in einem 50 ml Falcon vereinigt werden. Anschließend werden diese 4 Röhrchen nochmals mit 1x 5 ml 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0 gespült. Die Zellen werden durch diesen 1. Waschschrift von acht auf zwei Pellets eingengt. Es folgt eine Zentrifugation von 10 min bei 200 g und 4°C.

Die beiden Pellets werden durch zweimaliges Waschen (2. und 3. Waschschrift) mit jeweils 30 ml 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0 und erneuter Zentrifugation gereinigt und gesammelt. Nach dem 3. Waschschrift werden die Überstände möglichst gründlich entfernt und die beiden Zellpellets soweit mit 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0 überschichtet, dass in jedem Falcon ein Gesamtvolumen von 2,5 ml Virussuspension vorliegt (d.h. 2,5 ml abzüglich der oben ermittelten Pelletvolumina). Durch leichtes Schütteln wird die Suspension gemischt und anschließend bei -20°C gelagert.

2.6.3.3 CsCl-Gradient und Ultrazentrifugation

Gesättigte CsCl-Lösung: CsCl zu 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA

Benzonase (Benzon Nuclease): 10.000 U/ml

Sodium Desoxycholat: 5 g Na-desoxycholat in 100 ml H_2O

Die bei der Großproduktion des Virus gewonnenen Zellpellets (siehe 2.6.3.2) werden aufgetaut, mit 1/10 Volumen (250 μl) 5% Sodium Desoxycholat versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von 2 μl Benzonase pro Pellet soll die Lösung viskos werden. Diese Reaktion dauert 30-45 min. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation der Suspensionen für 10 min bei 1250 g. Der Überstand wird vorsichtig in ein 15 ml Greiner-Röhrchen überführt. Das entstandene Pellet wird solange bei -20°C aufbewahrt, bis die DNA- und Proteinkontrollen (siehe Kapitel 2.6.2.3 und 2.6.2.4) des isolierten Virus abgeschlossen sind. Der Überstand wird exakt auf 3,1 ml mit 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0 aufgefüllt. Dieses Volumen muss eingehalten werden, da das Zentrifugenröhrchen, in das die Suspension später eingefüllt wird, genau bis zur Markierung gefüllt werden muss. Als nächstes erfolgt die Zugabe von 1,8 ml CsCl-Lösung zu der Virussuspension. Dieses Gemisch wird mit Hilfe einer Pasteurpipette, die als Trichter dient, in ein Quick-Seal-Polyallomer-Zentrifugenröhrchen (Kapazität 5,1 ml, 13 x 51 mm) überführt. Dabei werden die 4,9 ml Virussuspension mit 300 μl 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0/CsCl-Lösung (Verhältnis 31:18) versetzt und so lange in das Röhrchen getropft, bis der Meniskus 1 mm hoch im Hals steht. Das Röhrchen wird im "Quickseal-Apparat" zugeschweißt und auf Dichtheit überprüft. Die Zentrifugation erfolgt in der Ultrazentrifuge TL100 im Rotor TLA 110 bei 120000 g für 24 h. Nach der Zentrifugation sollte die DNA etwa in der Mitte des Röhrchens (Schwebedichte ca. $1,7\text{g}/\text{cm}^3$) als graue Bande sichtbar sein.

Zapfen der DNA-Bande: Das Röhrchen wird in einer Stativklammer befestigt und zum Druckausgleich mit einer kleinen Kanüle (G 23) oben angestochen. Etwa 2 cm unterhalb der Bande wird das Röhrchen mit einer zweiten Kanüle (G 20) unter leichter Drehbewegung angestochen. Dabei die Kanülenöffnung direkt unterhalb der Bande positionieren und die DNA langsam in einem möglichst geringen Volumen in ein Eppendorfgefäß tropfen lassen.

Die gezapften DNA-Banden ein und desselben Virus (2 Pellets aus einer Großproduktion entsprechen 2 CsCl-Gradienten) werden vereint, mit 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0/CsCl-Lösung (Verhältnis 31:18) auf 4,9 ml aufgefüllt und ein zweites Mal einer CsCl-Gradienten-Zentrifugation unterzogen (gleiche Durchführung wie zuvor).

Der abgezapfte Virus wird in ein Kryotube überführt und bis zum weiteren Gebrauch bei 4°C gelagert.

2.6.4 Titration des Virus

2.6.4.1 Virusvorverdünnung

In zwei 24-well-Platten pro Virus werden in der ersten Spalte 990 µl PBS/2% FCS vorgelegt, in die restlichen Löcher jeweils 900 µl. Insgesamt werden Virusverdünnungen von 10^{-3} bis 10^{-13} hergestellt.

Von dem aufgereinigten Virus wird eine 1:10 Verdünnung in PBS/2% FCS (5 µl Virus plus 45 µl PBS/2% FCS) hergestellt und vorsichtig gevortext. Von dieser Lösung werden 10 µl zu den 990 µl PBS/2% FCS (1:100) pipettiert, die in der ersten Spalte der Platte vorgelegt wurden. Diese insgesamt 1000 µl werden gründlich gemischt und 100 µl davon werden in die nächste Spalte überführt (1:10). Dieser letzte Schritt wird so oft wiederholt bis in den 24-well-Platten Verdünnungen von 10^{-3} bis 10^{-13} vorliegen. In die zwölfte Spalte wird keine Virusverdünnung eingefüllt, sie dient für die spätere MOC (multiplicity of cells). Die Verdünnungen können über Nacht bei 4°C aufbewahrt oder direkt verwendet werden.

2.6.4.2 Titrierung

Bevor mit der Titration begonnen wird, müssen die Virusvorverdünnungen für 1–2 h bei Raumtemperatur inkubiert werden. Nach gutem Durchmischen der einzelnen Verdünnungen werden 200 µl/well auf eine mit HEK293LP-Zellen 80% bewachsene 24-well-Platte pipettiert. Die zwölfte Spalte der Platten dient dabei als MOC (multiplicity of cells), da sie nur mit PBS/2% FCS behandelt wird und das natürliche Ablöseverhalten der Zellen beobachtet werden soll. Wenn alle Zellen mit ihrer Virusverdünnung behandelt wurden, werden sie für eine Stunde leicht geschüttelt. Anschließend erfolgt eine vorsichtige Mediumzugabe von 1 ml MEM⁺⁺/5% FCS pro well.

Die Lochplatten werden für 2–3 Wochen im Virusbrutschrank inkubiert. Während der ganzen Titrierung erfolgt kein Mediumwechsel. Die Zellen müssen täglich auf das Vorkommen von Plaques überprüft werden.

3 Ergebnisse

Zu Beginn der hier vorliegenden Doktorarbeit existierten keine Veröffentlichungen über potentielle Interaktionspartner von Ror2 (Regeneron orphan receptor 2), weder hinsichtlich putativer extrazellulärer Liganden noch in Bezug auf intrazelluläre Signalmediatoren. Um die biologischen Aktivitäten von Ror2 insbesondere im Rahmen der Osteo- und Chondrogenese in einen größeren Zusammenhang einordnen zu können, ist es allerdings unerlässlich, mehr über den Signalweg bzw. die Signalwege, in die Ror2 involviert ist, zu erfahren. Zu diesem Zweck wurden Schwerpunkte auf die Identifikation von Interaktionspartnern und die Beeinflussung von bekannten Signalwegen gelegt. Innerhalb einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. S. Mundlos (Charité, Berlin) wurden für diese Untersuchungen das klonierte Wildtyp-Gen (Ror2wt) und zwei intrazelluläre Deletionsmutanten (Ror2 Δ Tyr und Ror2 Δ C) zur Verfügung gestellt. Diese Deletionen in Ror2 sind als verantwortlich für die Brachydaktylie Typ B beschrieben und stellen putativ dominant negative Varianten von Ror2 dar (bei Ror2 Δ Tyr muss man aufgrund der fehlenden Tyrosin-Kinase-Domäne von einem dominant negativen Charakter ausgehen, während dies für Ror2 Δ C erst noch gezeigt werden muss; siehe Kapitel 1.2.3). Zusätzlich wurden einige andere Mutanten von Ror2 konstruiert (Ror2Cterm, Ror2-Chimäre und diverse Ror2-Punktmutanten, auf deren Konstruktion und experimentelle Bedeutung noch später eingegangen wird).

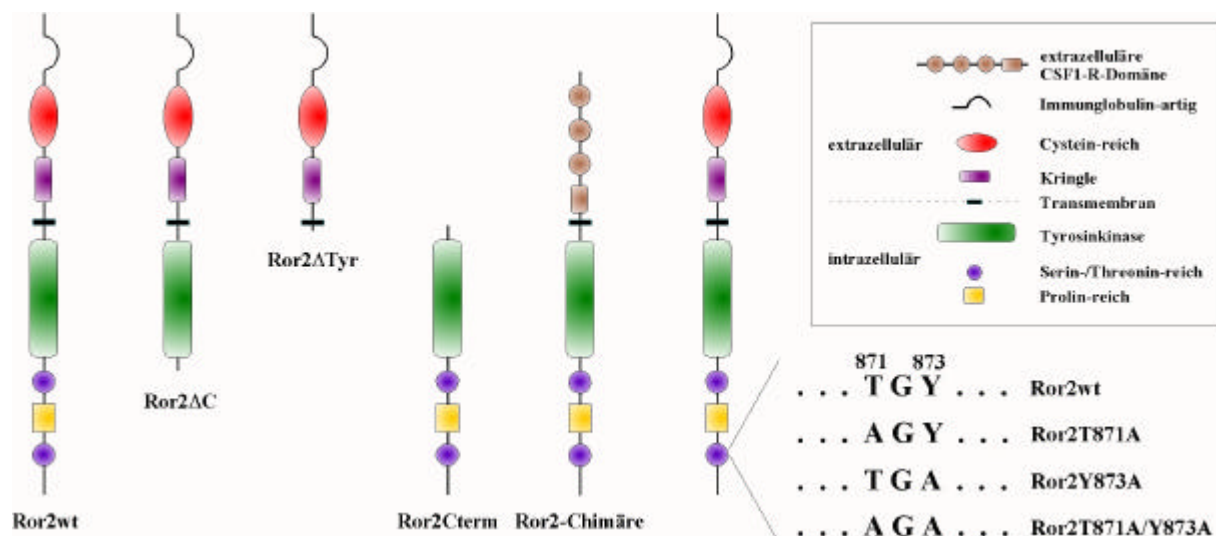


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Ror2-Varianten

Dargestellt sind die in dieser Arbeit zum Einsatz gekommenen Varianten von Ror2 (von links nach rechts): Ror2wt (Wildtyp), Ror2 Δ C (Deletion der C-Terminalen Serin-/Threonin- und Prolin-reichen Sequenzen), Ror2 Δ Tyr (membranständig, Deletion der intrazellulären Domänen), Ror2Cterm (löslicher intrazellulärer Teil von Ror2), Ror2-Chimäre (Fusionsprotein aus dem extrazellulären CSF1-Rezeptor (Colony Stimulating Factor) und dem intrazellulären Ror2) und die Punktmutanten Ror2T871A, Ror2Y873A und Ror2T871A/Y873A (Aminosäureaustausch in einem TGY-Motif am C-Terminus von Ror2, unten rechts) mit den dazugehörigen Domänen (Kasten, oben rechts)

Ein Ansatz, die Signalwege von Ror2 zu entschlüsseln, besteht darin, durch Überexpression des Rezeptors nachgeschaltete ("downstream") Faktoren und damit auch Signalwege zu aktivieren.

3.1 „Gain of function/ loss of function“-Analysen durch Überexpression von Ror2-Varianten

Es ist bekannt, dass die Überexpression von Tyrosin-Kinasen und Tyrosin-Kinase-Rezeptoren über Transphosphorylierung zu deren Aktivierung führen kann. Sollte demzufolge die Überexpression zu einer Aktivierung führen, könnte bei gleichzeitigem Vorhandensein endogener Interaktionspartner der von Ror2 regulierte Signalweg eingeschaltet und in der Folge auch relevante nachgeschaltete Faktoren beeinflusst werden. Im Gegensatz dazu sollten die putativ dominant negativen Varianten von Ror2 (Ror2 Δ Tyr und Ror2 Δ C) aufgrund ihrer intrazellulären Deletionen diesen Einfluss nicht ausüben können, sondern im Gegenteil durch Verdrängung von funktionellen endogenen Rezeptoren diese Signalwege sogar inhibieren („gain of function/ loss of function“).

Im folgenden soll anhand von zwei unterschiedlichen experimentellen Vorgehensweisen – transient in epithelialen HEK-Zellen und stabil in mesenchymalen Vorläuferzellen - der Einfluss der Überexpression von Ror2wt („gain of function“) bzw. der Mutanten Ror2 Δ Tyr und Ror2 Δ C („loss of function“) auf Signalwege bzw. die Aktivierung von Kinasen dargestellt werden.

3.1.1 Einfluss der transienten Überexpression von Ror2-Varianten auf das Phosphorylierungsverhalten von MAP-Kinasen

Rezeptor-Tyrosinkinasen, zu denen unter anderem auch Ror2 gehört, sind im allgemeinen in die Aktivierung von MAP-Kinasen (Mitogen-aktivierte Proteinkinasen) involviert. Als Beispiele können in diesem Zusammenhang die FGFRs (Fibroblast Growth Factor Receptors), MuSK (Muskel-Spezifische Kinase) oder IGF-1R (Insulin Growth Factor 1 Receptor) angeführt werden. FGFRs sind u.a. an der Aktivierung des ERK-Signalweges beteiligt, während MuSK den JNK-Signalweg und IGF-1R den p38-Signalweg beeinflusst. Da diese Signalwege auch in die Regulation der Chondro- und Osteogenese involviert und die entsprechenden Kinasen an zentralen Punkten dieser Signalwege zu finden sind, sollten diese Vertreter der MAP-Kinasen gezielt auf die Aktivierung durch eine Ror2-Überexpression untersucht werden.

Um zu analysieren, ob die Überexpression von Ror2 allein bereits einen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus dieser Kinasen besitzt, wurde Ror2wt in HEK-Zellen exprimiert und die gewonnenen Zellextrakte auf endogene, phosphorylierte Kinasen mittels Antikörpern, die spezifisch nur doppelt-phosphorylierte Motive in diesen Kinasen erkennen, untersucht. Diese Antikörper eignen sich besonders gut zur Analyse der Kinase-Aktivität, da die Phosphorylierung dieser beiden Aminosäuren notwendig ist, um die Effektorfunktion auszulösen. Gleichzeitig ist eine hohe Spezifität der Antikörper für die zu analysierenden Kinasen gegeben, obwohl sich die entsprechenden Erkennungssequenzen teilweise nur minimal voneinander unterscheiden (für p38 ...T*GY*..., für JNK ...T*PY*..., für ERK ...T*EY*...; * = Phosphorylierung). Parallel zur Überexpression von Ror2wt wurden auch Ror2 Δ C und Ror2 Δ Tyr in HEK-Zellen exprimiert. Als putativ dominant negative Varianten von Ror2 sollte ihre Überexpression sich nicht auf die MAP-Kinasen auswirken.

Als Positivkontrolle für diesen Versuch wurden HEK-Zellen mit TAK1wt transfiziert. Die Überexpression dieser MAP3K (Mitogen-Aktivierte Protein-Kinase-Kinase-Kinase) führt durch Autophosphorylierung zu ihrer Aktivierung und aufgrund des Einflusses auf viele unterschiedliche Signalwege auch zu einer Aktivierung der hier zu untersuchenden Kinasen (vgl. Einleitung).

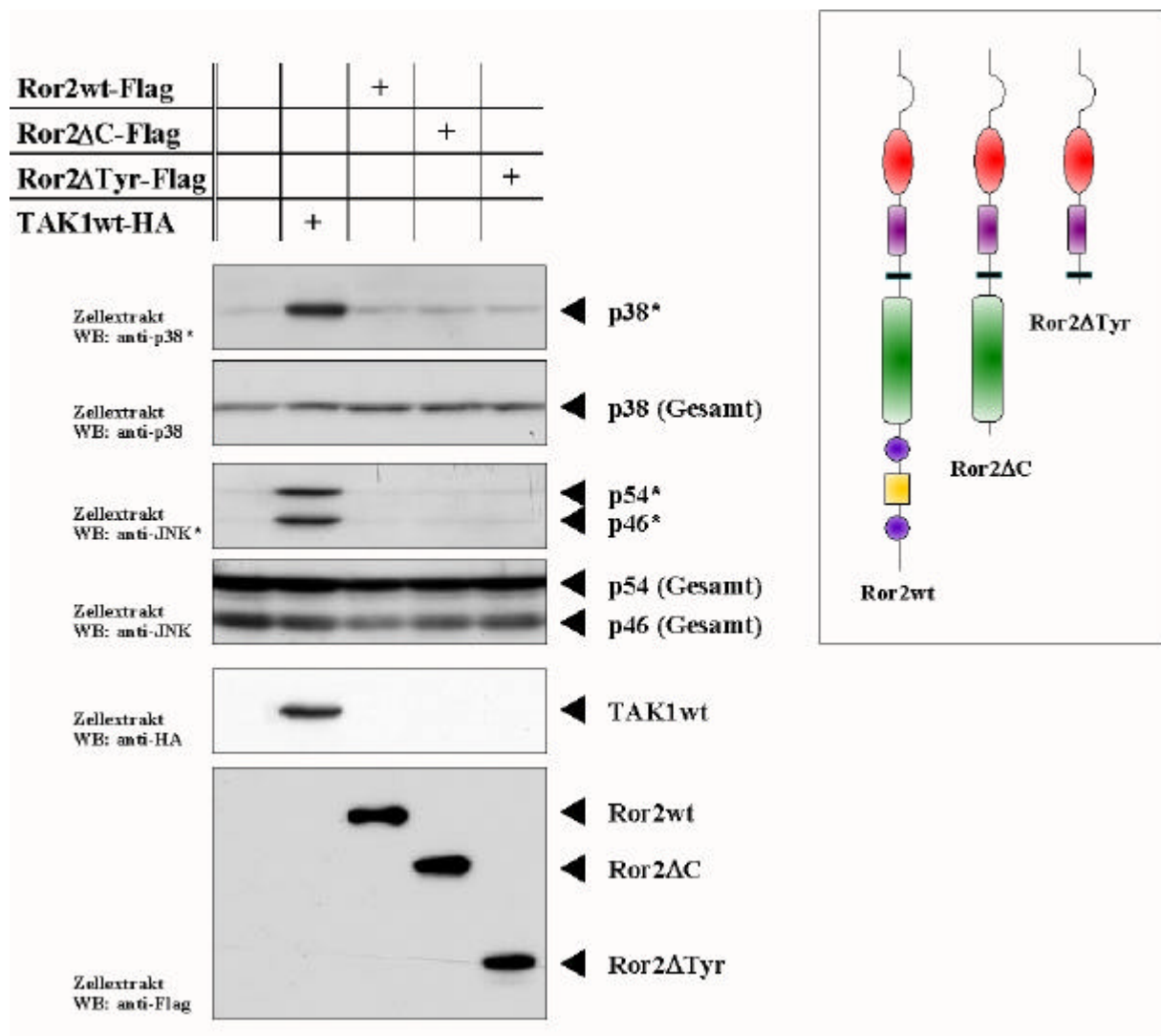


Abbildung 14: Transiente Überexpression von Ror2-Varianten führt nicht zur Aktivierung der endogenen MAP-Kinasen p38 und JNK

Die Überexpression von Ror2wt, Ror2ΔC, und Ror2ΔTyr (Flag; schematische Darstellung oben rechts) und TAK1wt (HA; dient der Positivkontrolle) in den Zellextrakten kann durch die Immunfärbung von Westernblots mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen werden (untere Bilder); eine gleichbleibende Expression der zu untersuchenden Kinasen ist auch bei Überexpression der oben genannten Proteine gewährleistet und durch die Antikörperfärbung der Gesamtkinasen demonstriert; eine gesteigerte Phosphorylierung der untersuchten Kinasen konnte nur in Gegenwart der Positivkontrolle (TAK1wt) festgestellt werden (p38*, p54* und p46*)

In Gegenwart von Ror2wt konnte keine Steigerung in der Phosphorylierung von p38 (p38*) oder den JNKs (p54* und p46*) festgestellt werden (Abbildung 14). Entsprechend konnte auch mit den Deletionsmutanten (Ror2ΔC und Ror2ΔTyr) kein Einfluss – insbesondere eine Verringerung - der Phosphorylierung dieser endogenen MAP-Kinasen beobachtet werden. Die Überexpression von TAK1wt hingegen führte unter analogen Bedingungen zu einer deutlichen Aktivierung sowohl von p38 als auch JNKs (=> Positiv-Kontrolle).

Ein vergleichbares Ergebnis konnte auch bei der Analyse der Phosphorylierung von ERK-Kinasen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Die Überexpression von Ror2wt allein in HEK-Zellen führt folglich nicht zu einer Aktivierung der untersuchten endogenen Signalwege.

An der Differenzierung von Geweben sind aber nicht nur diese ausgewählten Kinase-Signalwege beteiligt, sondern noch eine Vielzahl anderer Signalwege mit einer großen Bandbreite an Signalmediatoren, die im Rahmen einer solchen Untersuchung nicht alle erfasst werden können. Darum wurde parallel dazu versucht, einen Einfluss der Überexpression von Ror2 auf das Differenzierungsverhalten der murinen fibroblastoiden mesenchymalen Vorläuferzelllinie C3H10T $\frac{1}{2}$ nachzuweisen. C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen wurden ausgewählt, weil sie ein relativ frühes Stadium mesenchymaler Zelldeterminierung darstellen und durch das Einwirken von verschiedenen Faktoren wie Wachstumsfaktoren, Hormonen oder Vitaminen eine Differenzierung dieser Zellen in Osteoblasten, Chondrozyten, Adipozyten oder Muskelzellen möglich ist. Im Zusammenhang mit Ror2 soll die Analyse der Knochen- und Knorpelbildung (Osteo-/Chondrogenese), auf die sich Mutationen in Ror2 laut den Veröffentlichungen von Afzal et al., 2003 und Yoda et al., 2003 auswirken, im Vordergrund stehen.

3.1.2 Einfluss der Überexpression von Ror2-Varianten auf das Differenzierungsverhalten von mesenchymalen Vorläuferzellen

Zur Klärung der Frage, ob die Überexpression von Ror2 allein einen positiven Einfluss auf die osteo-/chondrogene Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen besitzt, wurden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen mit den Plasmiden pcDNA3 und Ror2wt/pcDNA3 stabil transfiziert. Nach der Zugabe von Selektionsmedium starben die nicht transfizierten Zellen nach kurzer Zeit ab, so dass Polyklone, die von Zellen mit einem aufgenommenen Plasmid abstammten, isoliert und vermehrt werden konnten. Die Zellen wurden so weit expandiert, bis die Zellzahl zum Einfrieren und für die Aussaat der Kinetik ausreichte. Die Differenzierung der Zellen wurde über einen begrenzten Zeitraum hinweg angeregt und mittels RT-PCR von Markergenen und histologischer Färbungen das Differenzierungsverhalten der unterschiedlichen Zelllinien dokumentiert.

Parallel dazu wurden rekombinant BMP2-exprimierende C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen (C3H10T $\frac{1}{2}$ _{BMP2}-Zellen) mit den Plasmiden pcDNA3, Ror2wt/pcDNA3 oder Ror2 Δ C/pcDNA3 transfiziert. Da diese Zellen aufgrund der hohen BMP2-Expression bereits eine starke osteo-/chondrogene Differenzierung aufweisen, können auf diese Weise mögliche negative Einflüsse der Überexpression der Ror2-Varianten auf diese Entwicklung visualisiert werden (der Ror2 Δ C-Mutante wurde bei diesen Experimenten der Vorzug gegenüber der Ror2 Δ Tyr-Mutante gegeben, da sie in vivo den stärkeren Phänotyp aufweist; siehe Kapitel 1.2.3).

Die in diesem Zusammenhang angewandten Methoden sind im Kapitel 2.4 beschrieben.

3.1.2.1 Histologische Färbungen

Die Entwicklungsrichtungen und ihre Ausprägungen können durch gezielte Färbungen der Zellen sichtbar gemacht werden.

Chondrozyten

In der frühen Phase ist ein Nachweis von Chondrozyten durch die Anfärbung von sauren und sulfatreichen Proteoglycanen mit Alcian Blau möglich. Reife Chondrozyten sind dabei anhand einer sie umgebenden intensiv blau gefärbten Matrix zu erkennen (siehe Kapitel 2.4.17).

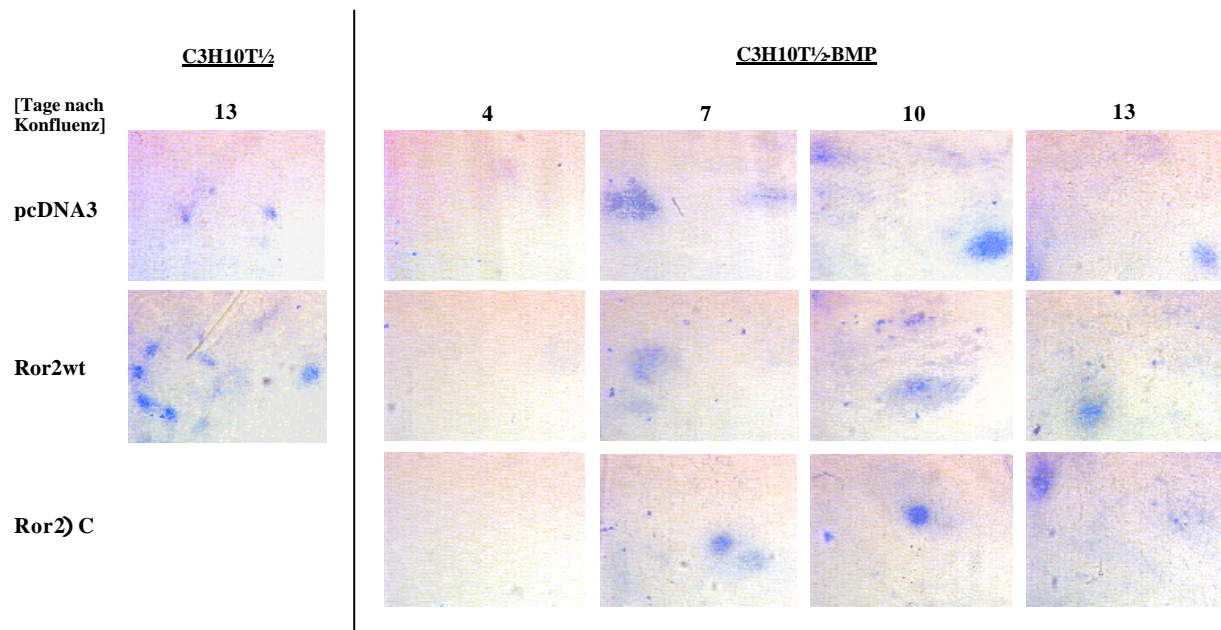


Abbildung 15: Chondrozytenfärbung von unterschiedlich transfizierten C3H10T^{1/2}- und C3H10T^{1/2}_{BMP2}-Zellen; Vergrößerung 1:40

Die Bildung von Chondrocyten wird durch das Anfärben von Proteoglykanen in der Zellmatrix durch den Farbstoff Alcian-Blau sichtbar gemacht. Dargestellt sind die Auswirkungen von überexprimierten Ror2-Varianten auf die Chondrogenese von C3H10T^{1/2}- (links) und rekombinant BMP2-exprimierenden C3H10T^{1/2}-Zellen (C3H10T^{1/2}_{BMP2}, rechts) zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung.

Zu den frühen Zeitpunkten zeigt keine der hier untersuchten C3H10T^{1/2}-Zellen eine histologisch nachweisbare Chondrozyten-Färbung (pcDNA3 und Ror2wt/pcDNA3 Tag -2 bis 4, Daten nicht gezeigt). Die relativ hohe Chondrozytenanzahl in den C3H10T^{1/2}-Zelllinien gegen Ende der Kinetik ist überraschend, da C3H10T^{1/2}-Zellen ohne Stimulus eigentlich nicht zu Chondrozyten differenzieren (pcDNA3 und Ror2wt/pcDNA3 Tag 13, Abbildung 15). Die Zellen stammten aus der 18. Passage, was die spontane Differenzierung verursacht haben könnte, da die C3H10T^{1/2}-Zellen mit zunehmender Passagenzahl zu degenerieren beginnen, d.h. ihre anfängliche Pluripotenz immer mehr einbüßen und schließlich in eine Entwicklungsrichtung gedrängt werden. Die Überexpression von Ror2wt in den C3H10T^{1/2}-Zellen hat eine leichte Stimulierung der chondrogenen Entwicklung zur Folge.

Die C3H10T^{1/2}_{BMP2}-Kontrollzellen zeigen nach einigen Tagen wie erwartet eine BMP2-induzierte Chondrogenese, die deutlich stärker ausfällt als in den C3H10T^{1/2}-Zellen (pcDNA3 ab Tag 7, Abbildung 15). Dieser BMP2-induzierte Effekt wird durch die Überexpression von Ror2wt bzw. Ror2ΔC weder erkennbar verstärkt noch abgeschwächt (ab Tag 7, Abbildung 15).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Ror2wt einen erkennbaren Einfluss auf die Differenzierung von C3H10T^{1/2}-Zellen in Richtung der Chondrogenese besitzt, dieser aber

durch die weit stärkeren Auswirkungen der rekombinanten BMP2-Expression überlagert wird.

Osteoblasten

Die Alkalische Phosphatase (AP) wird von Osteoblasten in der frühen Differenzierungsphase und von prä-/hypertrophierenden Chondrozyten in der späten Phase exprimiert. Um die Expression von AP nachzuweisen wird auf die fixierten Zellen BCIP/NBT gegeben (siehe Kapitel 2.4.17). Hierbei fällt der Farbstoff aus, und die Zellen, die alkalische Phosphatase exprimieren, werden intensiv dunkel violett gefärbt. Dies ist ein Hinweis auf reifende und reife Osteoblasten.

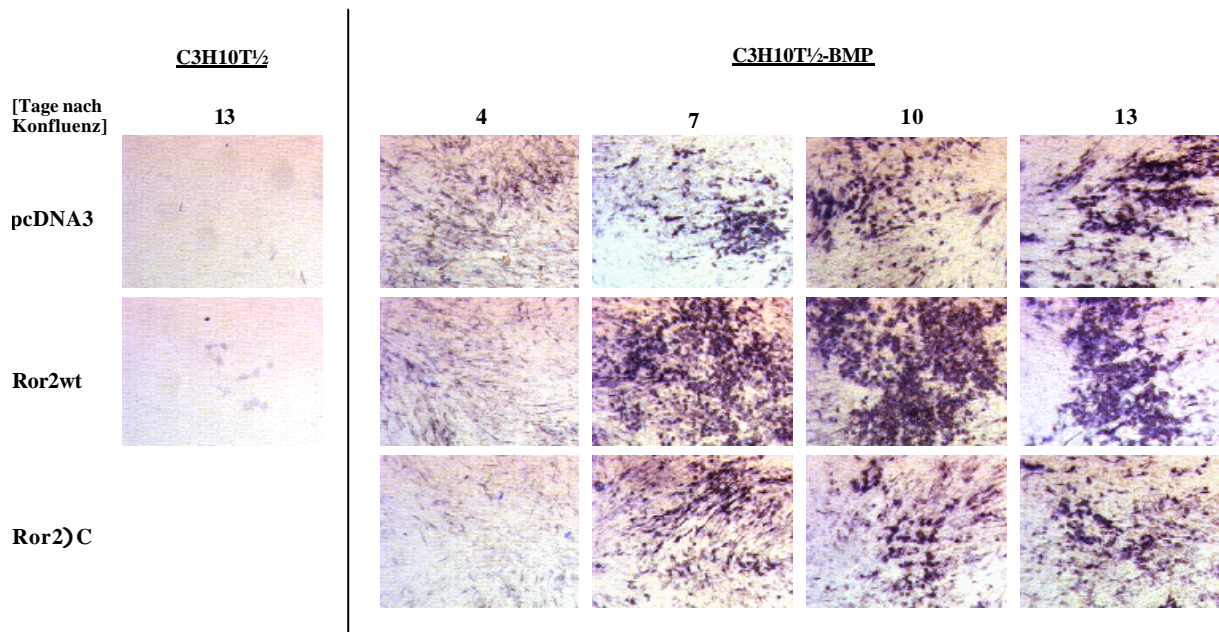


Abbildung 16: Osteoblastenfärbung von unterschiedlich transfizierten C3H10T^{1/2}- und C3H10T^{1/2}_{BMP2}-Zellen; Vergrößerung 1:40

Die Bildung von Osteoblasten wird durch die enzymatische Aktivität der Alkalischen Phosphatase und der dadurch bedingten intensiv dunkel violetten Färbung der Zellen bei Zugabe von BCIP/NBT sichtbar gemacht. Dargestellt sind die Auswirkungen von überexprimierten Ror2-Varianten auf die Osteogenese von C3H10T^{1/2}- (links) und rekombinant BMP2-exprimierenden C3H10T^{1/2}-Zellen (C3H10T^{1/2}_{BMP2}, rechts) zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung.

Sowohl die C3H10T^{1/2}-Kontrollzellen (pcDNA3) als auch die Ror2-exprimierenden C3H10T^{1/2}-Zellen (Ror2wt/pcDNA3) zeigen auch am 13. Tag noch keine nennenswerte AP-Aktivität. Es lässt sich daraus ableiten, dass Ror2wt alleine die Osteogenese nicht stimulieren kann (Tag 13, Abbildung 16).

Bei den rekombinant BMP2-exprimierenden C3H10T^{1/2}-Zellen findet eine Anfärbung der Osteoblasten wie erwartet direkt nach Beginn der Differenzierung statt (ab Tag 4, Abbildung 16). Dieser BMP2-induzierte Effekt wird durch die Überexpression von Ror2wt verstärkt, insbesondere in der Hinsicht, dass die Osteoblasten in kompakterer Form auftreten (beginnende Nodule-Bildung; Ror2wt ab Tag 7, Abbildung 16). Die Überexpression von Ror2ΔC hingegen weist keine solche Stimulation auf, sondern zeigt einen leicht abschwächenden Effekt im Vergleich zur Kontrolle (Ror2ΔC ab Tag 4, Abbildung 16).

Eine Alternative zum Nachweis der Differenzierung von Zellen in eine bestimmte Richtung mittels histologischer Färbungen stellt die Markergenanalyse in RT-PCRs dar.

3.1.2.2 Untersuchung der Genexpression osteo-/chondrogener Markergene in transfizierten C3H10T^{1/2}- und rekombinant BMP2-exprimierenden C3H10T^{1/2}-Zellen (C3H10T^{1/2}_{BMP2}) während der Differenzierung

Zunächst wurde eine PCR zur Amplifikation des Haushaltsgens HPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase) durchgeführt. Sie dient dem Abgleich der synthetisierten cDNAs der einzelnen Proben. Auf dieser Grundlage des HPRT-Abgleiches (Abbildung 17) konnte die Expression der Ror2-Varianten und der Markergene der Osteo-/Chondrogenese untersucht werden.

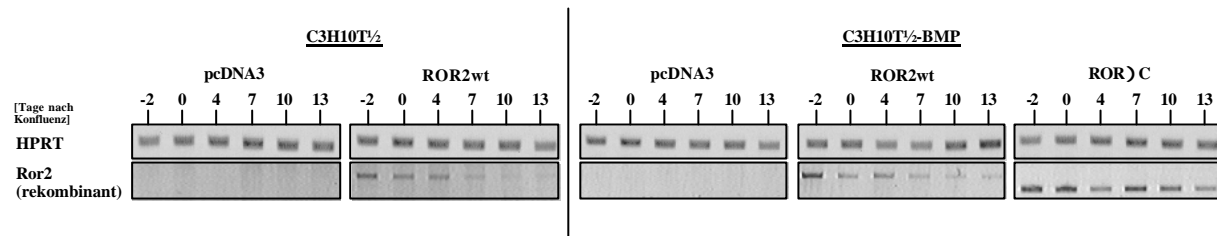


Abbildung 17: Rekombinante Expression von Ror2-Varianten in C3H10T^{1/2}- (links) und C3H10T^{1/2}_{BMP2}-Zellen (rechts)

Dargestellt ist die Expression von rekombinant exprimierten Ror2-Varianten im Vergleich zum Haushaltsgen HPRT anhand von PCRs mit spezifischen Primern (HPRT = 1 µl 1:100, Annealing Temp. 52°C, 33 Zyklen; Ror2 (rekombinant) = 1 µl pur, Annealing Temp. 52°C, 35 Zyklen)

Durch die Amplifikation mit einem Ror2-internen und einem vektorspezifischen Primer (siehe Kapitel 6.1) über den C-Terminus von Ror2 erhalten wir für die Zelllinien, die mit Ror2wt oder Ror2ΔC stabil transfiziert wurden, PCR-Produkte mit unterschiedlichen Größen, während in den Kontrollzelllinien (pcDNA3) erwartungsgemäß keine rekombinante Expression von Ror2-Varianten beobachtet werden konnte (Abbildung 17). Dabei zeigte sich, dass die Expression des rekombinanten Ror2wt im Verlauf der Kinetik deutlich abnimmt.

Als Markergene bezeichnet man Gene, die charakteristisch in Zelllinien einer bestimmten Entwicklungsrichtung exprimiert werden. Oftmals stehen diese Genprodukte in direktem Zusammenhang mit der Funktion des differenzierten Gewebetyps.

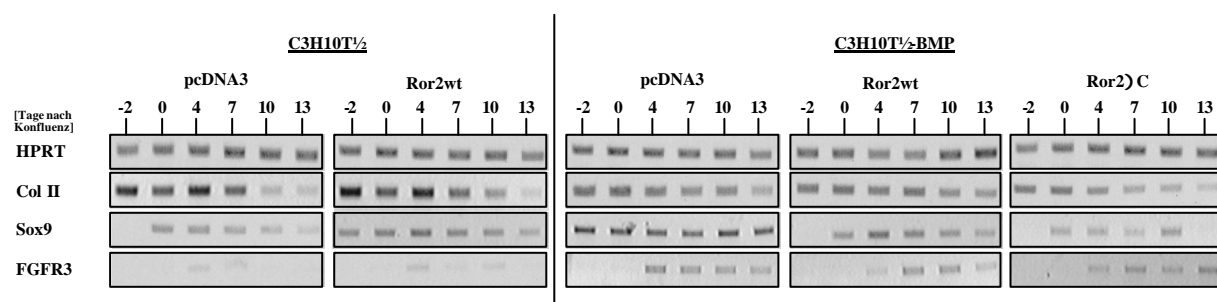


Abbildung 18: Einfluss der Überexpression von Ror2-Varianten auf die Expression chondrogener Markergene in C3H10T^{1/2}- (links) und C3H10T^{1/2}_{BMP2}-Zellen (rechts)

Dargestellt ist die Expression von chondrogenen Markergenen im Vergleich zum Haushaltsgen HPRT anhand von PCRs mit spezifischen Primern (HPRT = 1 µl 1:100, Annealing Temp. 52°C, 33 Zyklen; Col II = 1 µl 1:10, Annealing Temp. 54,6°C, 28 Zyklen; Sox9 = 1 µl 1:10, Annealing Temp. 64,1°C, 30 Zyklen; FGFR3 = 1 µl 1:10, Annealing Temp. 55°C, 30 Zyklen)

Kollagen Typ II ist ein Homotrimer aus drei α1(II)-Ketten und stellt den weitaus größten Anteil der Chondrozytenmatrix dar (Robey, 1989; Erlebacher et al. 1995). Aufgrund seiner starken Expression gilt es als wichtigster Marker der Chondrogenese und muss nach den

Ergebnissen der Histologie als richtungsweisend für die folgenden Untersuchungen von Ror2 betrachtet werden.

Die Expression von Kollagen Typ II in den verschiedenen Zelllinien und verschiedenen Differenzierungsstadien wurde durch Amplifikation der $\alpha 1(\text{II})$ -Kette des Kollagens Typ II aus den cDNA-Verdünnungen mittels PCR mit Col-2A1-Primern (siehe Kapitel 6.1) untersucht.

Bereits in den C3H10T $\frac{1}{2}$ -Kontrollzellen (pcDNA3, Abbildung 18) wird Kollagen Typ II in überraschend hohem Ausmaß exprimiert, und diese Expression wird in Ror2wt-überexprimierenden Zellen (Abbildung 18, C3H10T $\frac{1}{2}$ Ror2wt) auch nicht verstärkt. Die C3H10T $\frac{1}{2}$ _{BMP2}-Zellen (Abbildung 18) zeigen erwartungsgemäß eine starke Expression von Kollagen Typ II, da in diesen Zellen überexprimiertes BMP2 die Chondrogenese induziert, auch wenn sie im Vergleich zu den C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen aufgrund der dort ungewöhnlich hohen Expression hier zu gering ausfällt. Da Kollagen Typ II ein sehr früher Marker der Chondrogenese ist, erklärt dies, warum in allen Zelllinien die Expression von Kollagen Typ II im Laufe der Differenzierung abnimmt. Ein eindeutiger regulatorischer Einfluss der Ror2-Varianten ist entsprechend den Ergebnissen der Histologie nicht zu erkennen.

Sox9 ist ein Transkriptionsfaktor, der an ein 48-bp-langes chondrocyten-spezifisches Enhancer-Element unter anderem in den Genen von pro $\alpha 1(\text{II})$ collagen (Col2a1), einem frühen und wichtigen Marker von Chondrocyten bindet und es aktiviert (de Crombrughe et al., 2000). Sox9 ist verantwortlich für die Chondrocyten-Differenzierung und die Expression der chondrozyten-spezifischen Markergene Col2a1, Col9a2, Col11a2 und Aggrecan und kontrolliert vermutlich auch die Expression von Zelloberflächenproteinen, die für die mesenchymale Kondensation benötigt werden.

Die Expression von Sox9 in den verschiedenen Zellen und verschiedenen Differenzierungsstadien wurde durch Amplifikation eines 406-bp-langen Fragments aus den cDNA-Verdünnungen mittels PCR mit Sox9-Primern (siehe Kapitel 6.1) untersucht.

Die PCR-Analyse zeigt (Abbildung 18), dass in den C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen Sox9 exprimiert wird. Dies ist nicht ungewöhnlich und wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet. Ein eindeutiger Effekt des transfizierten Ror2wt auf die Expression von Sox9 ist allerdings nicht erkennbar (Ausfall der PCR bei Tag 4). Die C3H10T $\frac{1}{2}$ _{BMP2}-Zellen zeigen im Vergleich dazu eine stärkere Expression von Sox9 (insbesondere zu den frühen und späten Zeitpunkten Tag -2 und 13), die durch die zusätzliche Überexpression von Ror2wt oder Ror2 ΔC wieder leicht herabgesetzt wird.

FGFR3 ist ein Tyrosinkinase-Rezeptor und stellt zumindest in Adulten einen negativen Regulator der endochondralen Ossifikation dar (Ornitz, 2001). Über einen mitogen-aktivierten Proteinkinase-Pathway (MAPK-Pathway) stimuliert er dort die Expression von Transkriptionsfaktoren (wie z.B. Sox9). Für embryonale Zellen ist dies zwar bisher noch nicht gezeigt worden, aber aufgrund der gegensätzlichen Auswirkungen von FGFR3 und Ror2 auf die proliferative Zone wurde dieser Marker untersucht.

Die Expression von FGFR3 in den verschiedenen Zellen und verschiedenen Differenzierungsstadien wurde durch Amplifikation eines 550-bp-langen Fragments aus den cDNA-Verdünnungen mittels PCR mit FGFR3-Primern (siehe Kapitel 6.1) untersucht.

Die PCR-Analyse zeigt (Abbildung 18), dass in den C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen FGFR3 nur in sehr geringem Ausmaß exprimiert wird, ein eindeutiger Effekt des transfizierten Ror2wt auf die Expression von FGFR3 ist dabei nicht erkennbar. In den C3H10T $\frac{1}{2}$ _{BMP2}-Zellen findet die Expression im wesentlichen zu den mittleren und späten Zeitpunkten statt (Tag 4, 7, 10 und 13). Ein Einfluss der Ror2-Varianten auf diese Expression konnte ebenfalls nicht festgestellt werden.

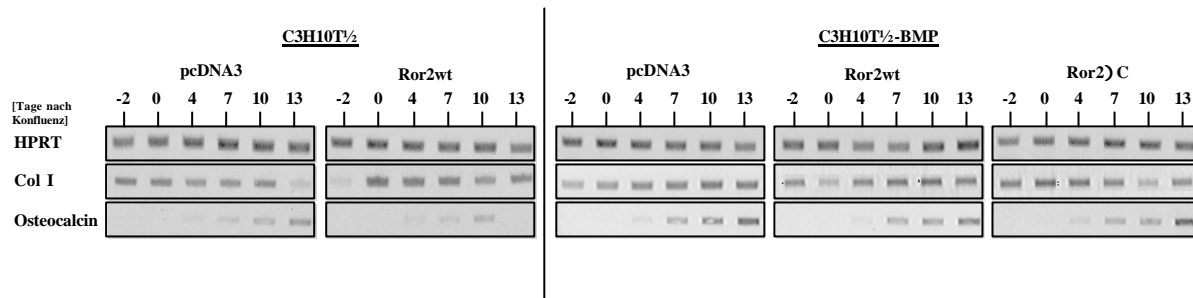


Abbildung 19: Einfluss der Überexpression von Ror2-Varianten auf die Expression osteogener Markergene in C3H10T1/2- (links) und C3H10T1/2BMP2-Zellen (rechts)

Dargestellt ist die Expression von osteogenen Markergenen im Vergleich zum Haushaltsgen HPRT anhand von PCRs mit spezifischen Primern (HPRT = 1 µl 1:100, Annealing Temp. 52°C, 33 Zyklen; Col I = 1 µl 1:10, Annealing Temp. 51,8°C, 30 Zyklen; Osteocalcin = 1 µl 1:10, Annealing Temp. 56,6°C, 27 Zyklen)

In Osteoblasten-Zellkulturen werden während der Differenzierung eine Anzahl von Genen exprimiert, die Bestandteile der extrazellulären Matrix kodieren und somit deren Bildung ermöglichen. Zu diesen Matrixbestandteilen gehört das fibrilläre Kollagen Typ I. Dieses Protein besteht aus zwei $\alpha 1(I)$ -Ketten und einer $\alpha 2(I)$ -Kette und stellt die Hauptkomponente der Knochenmatrix dar. Es kommt weiterhin auch in den meisten Bindegeweben wie Haut und Sehnen, nicht jedoch im Knorpelgewebe vor (Robey, 1989), und ist somit ein früher Marker der Osteogenese (Heersche et al., 1992; Helder et al. 1993).

Die Expression von Kollagen Typ I in den verschiedenen Zellen und verschiedenen Differenzierungsstadien wurde durch Amplifikation der $\alpha 1(I)$ -Kette des Kollagens Typ I aus den cDNA-Verdünnungen mittels PCR mit Col-1A1-Primern (siehe Kapitel 6.1) untersucht (PCR-Produkt 253 bp).

Die PCR-Analyse zeigt (Abbildung 19), dass in den C3H10T1/2-Zellen Kollagen Typ I stark exprimiert wird, ein eindeutiger Effekt des transfizierten Ror2wt auf die Expression von Kollagen Typ I ist allerdings nicht erkennbar. In den C3H10T1/2BMP2-Zellen wird Kollagen Typ I ebenfalls stark exprimiert, aber auch hier ist eine deutliche Veränderung in der Expression bedingt durch die Transfektion mit den Ror2-Varianten nicht zu beobachten.

Osteocalcin ist ein kleines (49 Aminosäuren), γ -Carboxyglutaminsäure-haltiges, Ca^{2+} -bindendes Protein (Hauschka und Gallop, 1977), welches mit 10 bis 20 % den Hauptbestandteil der nicht-kollagenen Proteine der Knochenmatrix darstellt. Es wird ausschließlich im Knochen exprimiert (Carlson et al., 1993) und gilt daher als Marker für Osteoblasten während der Knochenbildung (Hauschka, 1986). Die Osteocalcin-Transkription wird von verschiedenen Faktoren wie Vitamin A, Vitamin D-Rezeptor und dem jun-fos-Komplex AP1 (Schule et al., 1990) reguliert.

Die Expression von Osteocalcin in den verschiedenen Zellen und verschiedenen Differenzierungsstadien wurde durch PCR mit Osteocalcin Primern (siehe Kapitel 6.1) untersucht (PCR-Produkt 419 bp).

Die PCR-Analyse zeigt (Abbildung 19), dass in den C3H10T1/2-Zellen Osteocalcin in geringem Maße gegen Ende der Kinetik exprimiert wird, ein eindeutiger Effekt des transfizierten Ror2wt auf die Expression von Osteocalcin ist allerdings nicht erkennbar. Durch die rekombinante Expression von BMP2 kommt es wie erwartet zu einer Verstärkung der Osteocalcin-Expression, aber auch hier sind keine Auswirkungen aufgrund der Transfektion mit den Ror2-Varianten zu beobachten.

Zusammengefasst sind Auswirkungen der Überexpression von Ror2-Varianten sowohl auf das Phosphorylierungsverhalten von MAP-Kinasen als auch auf das Differenzierungsverhalten von mesenchymalen Vorläuferzellen nur gering und nicht eindeutig ausgeprägt. Aus diesen Erkenntnissen muss der Schluss gezogen werden, dass in den verwendeten Zelllinien entscheidende Bestandteile der Ror2-beeinflussten Signalwege endogen nicht stark genug exprimiert werden oder Ror2 keinen Einfluss auf die hier untersuchten Differenzierungsrichtungen und Signalwege besitzt.

3.2 Liganden-abhängige Aktivierung von Ror2

Da eine Aktivierung von Ror2 und damit verbunden eine Stimulierung von endogenen Signalwegen durch die Überexpression von Ror2-Varianten weder stabil in C3H10T $\frac{1}{2}$ - noch transient in HEK-Zellen stattgefunden hat, wurde nach Alternativen gesucht, um Ror2 ohne Kenntnis eines Liganden zu aktivieren. Die Interaktion von Ror2 mit Vertretern der Wnt-Familie war zu diesem Zeitpunkt noch nicht veröffentlicht und wird deshalb erst deutlich später in dieser Arbeit berücksichtigt. In verschiedenen Veröffentlichungen (Chaika et al., 1997; Chang et al., 1998) wird mit chimären Rezeptorkonstrukten gearbeitet, um intrazelluläre Rezeptoraktivität unabhängig von der Bindung des Rezeptors an seinem eigentlichen Liganden zu generieren. Bei der Suche nach einem geeigneten Liganden fiel die Wahl auf CSF-1 (Colony Stimulating Factor 1), da er endogen nicht in mesenchymalen Stammzellen exprimiert wird und somit keine konkurrierende Stimulierung von endogenen Signalwegen stattfindet. Demzufolge sollte ein chimärer Rezeptor bestehend aus den intrazellulären und den transmembranen Ror2-Domänen und der extrazellulären CSF-1-R-Domäne (Colony Stimulating Factor 1 Receptor) konstruiert werden.

3.2.1 Herstellung eines chimären Rezeptors aus dem CSF1-Rezeptor und Ror2 und Klonierung in den eukaryotischen Expressionsvektor pMT7T3

Zunächst wurden der extrazelluläre CSF-1-R-Teil (Primer: CSF1R 5'/CSF1R 3'; siehe Kapitel 6.1) bis zur transmembranen Region und der intrazelluläre Ror2-Teil (Primer: ROR2 TM/ROR2 3'; siehe Kapitel 6.1) inklusive der Transmembranregion getrennt amplifiziert (verwendete Polymerase: Pfu TurboTM von STRATAGENE), phenolisiert und aufgereinigt. Der Primer ROR2 TM wurde so konstruiert, dass er an seinem 5'-Ende 24 über die Transmembranregion hinausgehende Basen besitzt, die es ihm ermöglichen, mit dem 3'-Ende des extrazellulären CSF1R-Teils zu hybridisieren.

In einem zweiten Schritt dienten diese beiden Fragmente als Template für eine weitere PCR mit den Primern CHIM FWD und CHIM REV (verwendete Polymerase: HerculaseTM von STRATAGENE). Als Ergebnis erhielten wir ein Produkt, das mit den dazugehörigen Restriktionsenzymen (siehe Kapitel 2.1.5) verdaut und aufgereinigt wurde.

Diese Chimäre wurde in den mit Not I/Sal I-geschnittenen, dephosphorylierten pMT7T3-Vektor kloniert. Ein Aliquot des Ligationsproduktes wurde in E.coli SURE transformiert. Die Bakterien wurden auf Ampicillin-Agarplatten in verschiedenen Volumina ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden einzelne Kolonien in einem PCR-Ansatz mit vektorspezifischen und genspezifischen Primern (ROR INT3 FWD bzw. T3; siehe Kapitel 6.1) übertragen und eine PCR zum Nachweis rekombinanter Bakterienklone durchgeführt (siehe Kapitel 2.1).

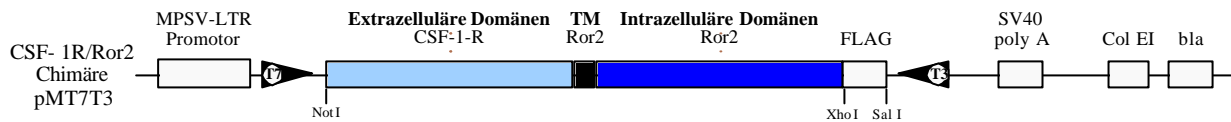


Abbildung 20: Chimäre kloniert in pMT7T3-Vektor (MPSV-LTR = Myeloproliferativer Sarkomvirus (long terminal repeat); SV40 = Simian-Virus 40; Col EI = origin of replication; bla = β -Lactamase (verantwortlich für die Ampicillin-Resistenz); TM = Transmembrandomäne)

Diese Plasmide wurden isoliert und unter Zuhilfenahme geeigneter Primer (T7, T3, CSF1R INT1 FWD, CSF1R INT1 REV, CSF1R INT2 FWD, CSF1R INT2 REV, ROR INT1 FWD, ROR INT1 REV, ROR INT2 FWD, ROR INT2 REV, ROR INT3 FWD, ROR INT6 FWD; siehe Kapitel 6.1) das komplette chimäre Insert einschließlich der angrenzenden Vektorregionen durchsequenziert, um Fehler bei der Synthese der Chimäre oder bei der Restriktion/Ligation ausschließen zu können. Mittels des Programms SeqMan (DNASTAR Inc.) konnten die erhaltenen Sequenzen mit den bekannten CSF1R-, Ror2- und pMT7T3-Sequenzen verglichen werden.

3.2.2 CSF-1-abhängige Differenzierung von stabil CSF-1-R/Ror2-Chimäre transfizierten mesenchymalen Vorläuferzellen C3H10T $\frac{1}{2}$

Die Überexpression der Ror2-Chimäre stabil in C3H10T $\frac{1}{2}$ - oder transient in HEK-Zellen und die anschließende Stimulierung mit dem Medium zugeführten CSF-1 in unterschiedlichen Dosierungen hatte keine Auswirkungen auf die untersuchten endogenen Signalwege. Es konnte weder ein Einfluss auf die osteo-/chondrogene Entwicklung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen noch eine Stimulierung der MAP-Kinase-Signalwege in HEK-Zellen dokumentiert werden (Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse stärken die Vermutung, dass Ror2 nicht allein durch die Interaktion mit einem Liganden aktiviert und dadurch ein Ror2-abhängiger Signalweg stimuliert wird, sondern dass Ror2 vielmehr die Aktivität anderer Rezeptoren in der Funktion eines Co-Rezeptors reguliert und für diese Funktion die Bindung des nativen Liganden von entscheidender Bedeutung ist.

3.3 Suche nach potentiellen Ror2-Bindungspartnern im Yeast Two Hybrid Screen

Da die vorangegangenen Versuche keine eindeutigen Hinweise auf Ror2-abhängige Signalwege geliefert haben, wurde eine Suche nach putativen Interaktionspartnern von Ror2 mit Hilfe des Yeast Two Hybrid Systems durchgeführt.

Da es sich bei Ror2 um einen Rezeptor handelt, ist es von Interesse, sowohl extra- als auch intrazelluläre Interaktionspartner (d.h. Liganden und Mediatoren seiner Signalkaskade) zu identifizieren. Deshalb wurden der N-terminale (extrazelluläre) und der C-terminale (intrazelluläre) Teil getrennt in den Vektor pGBKT7 (BD-Vektor, dient der Synthese eines Fusionsproteins aus dem auf Interaktion zu untersuchenden Protein und der DNA-Bindungsdomäne des Transkriptionsfaktors Gal4) kloniert und in AH109-Hefezellen transformiert (die Transmembranregion und das Signalpeptid wurden bei diesen Versuchen nicht berücksichtigt, um unspezifische – insbesondere hydrophobe – Wechselwirkungen zu vermeiden). Anschließend wurden die transformierten AH109-Hefezellen auf ihre Fähigkeit, Autoaktivierung der Reportergene auszulösen, untersucht.

Die hier eingesetzten Methoden sind im Kapitel 2.1 und 2.5 beschrieben.

3.3.1 Klonierung der N-terminalen/C-terminalen Domänen in den BD-Vektor pGBKT7 des MATCHMAKER Two Hybrid Systems

Um Interaktionen der N- bzw. C-terminalen Domäne von Ror2 mit anderen Proteinen im Two-Hybrid-System untersuchen zu können, wurden der N- bzw. C-Terminus von Ror2 in den BD-Vektor pGBKT7 kloniert. Dazu wurden der N- bzw. C-Terminus von Ror2 mit Klonierungsprimern (BD-ROR-FWD \overline{r} eu/EXT-REV für den N-terminalen, INT-FWD/BD-ROR-REV für den C-terminalen Teil), die jeweils am 5'-Ende eine Restriktionsstelle für NdeI und am 3'-Ende eine Restriktionsstelle für SalI generieren, aus einer Ror2-cDNA amplifiziert. Die Amplifikate wurden dann wie auch der BD-Vektor mit NdeI/SalI geschnitten und die jeweiligen DNAs in den Vektor ligiert.

3.3.2 β -Galactosidase-Assay/Aminotriazol-Test von transformierten Hefen

Nach der Transformation der Hefen wurden sie zur Selektion auf SD-Mangelmedium (-Trp, -His, -Ura, +2,5 mM 3-AT) kultiviert, wobei der pGBKT7-Vektor den Tryptophanmangel TRP-1 kompensiert und das 3-Aminotriazol der Unterdrückung des HIS3-Proteins dient („leaky promotor“, siehe Kapitel 2.5.1). Im β -Galactosidase-Assay wurden danach die Hefekclone mit einer geringen β -Galactosidase-Autoaktivität (minimale Blaufärbung) identifiziert und für die Transformation der cDNA-Bank verwendet.

3.3.3 Transformation der cDNA-Bank in mit BD-Vektor transformierte Hefen

Die bereits mit BD-Vektor (ROR2-N/ROR2-C) transfizierten Hefen wurden \ddot{U} N in Selektionsmedium (-Trp) und tagsüber in YPAD-Medium (siehe Kapitel 2.5.1.5) herangezchtet und anschließend mit pACT2-Vektoren der cDNA-Library (AD-Vektoren) transfiziert. Die transfizierten Hefezellen wurden auf SD-Mangelmedium (-Trp, -Leu, -His, -Ade) ausgestrichen und 6 Tage bei 30°C inkubiert. Dies diente der Selektion der doppelt-transformierten Hefen (der pGBKT7-Vektor kompensiert den Tryptophanmangel (TRP1), der pACT2-Vektor kompensiert den Leucinmangel (LEU2), die Interaktion der beiden Fusionsproteine kompensiert den Histidinmangel (gal1-HIS3-Gen, siehe Kapitel 2.5.1)). Anschließend wurden die Klone, insgesamt 180 für ROR2-N und 172 für ROR2-C, im β -Galactosidase-Assay und auf Rotfärbung untersucht.

3.3.4 β -Galactosidase-Assay/Rotfärbung der doppelt transformierten Hefen

Im β -Galactosidase-Assay wurden durch eine deutliche Blaufärbung die Klone identifiziert, die eine Interaktion der beiden rekombinanten Fusionsproteine aufgewiesen haben (siehe Kapitel 2.5.1.4). Die Rotfärbung auf Adenin-Mangelmedium hingegen zeigt die Klone, die falsch positiv für eine solche Interaktion sind.

Nur die Klone, die eine deutliche Blaufärbung und keine Rotfärbung aufwiesen, wurden für die weiteren Analysen verwendet. Für die Identifizierung der Interaktionspartner wurden diese Hefekclone lysiert, die in den AD-Vektor klonierten DNAs amplifiziert, aufgereinigt und sequenziert.

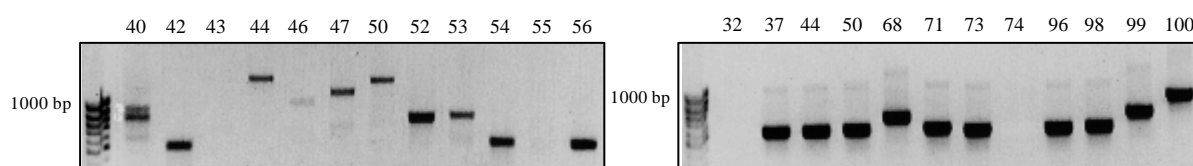


Abbildung 21: Beispiel-Inserts der AD-Vektoren auf 1%igem LMP-Gel (Hefekclone 40-56 für Interaktion mit C-Terminus (links), Hefekclone 32 bis 100 für Interaktion mit N-Terminus (rechts), mit AD-Primern amplifiziert (Längenmarker 100 bp-Ladder MBI Fermentas))

Die erhaltenen Sequenzen aus der Sequenzierung mit dem ABI Prism 310 Genetic Analyzer wurden in Datenbanken (Blast-search) mit bekannten Sequenzen verglichen. Die Hefeklonen, die bezüglich einer Ror2-Protein-Interaktion als interessant eingestuft worden sind, wurden auf falsch positive Signale untersucht.

3.3.5 Ror2-Protein-Interaktionen

Die Untersuchung der Hefeklonen bezüglich ihres AD-Vektor-Inserts ergab nach Sequenzierung dieser Inserts, dass Ror2 möglicherweise mit einer Vielzahl von Proteinen interagieren kann. Es wurden Interaktionspartner mit richtigem Leseraster und richtiger Orientierung im AD-Vektor nachgewiesen, teilweise sogar mehrmals in unterschiedlichen Hefeklonen.

Nicht aufgeführt sind hier cDNA-Inserts, die nicht im Leseraster waren, eine falsche Orientierung besaßen oder deren Natur unbekannt ist:

Interaktionspartner	Beschreibung	Interaktion mit N-/C-Terminus von Ror2
Fibulin-5/DANCE	Extrazelluläre Matrix-Glykoproteine, present in prä-chondralem Gewebe und Knorpel, bindet mit seinem C-Terminus	N-Terminus
Proline-rich protein Bprp	=DAZAP2 (DAZ (deleted in azoospermia)-assoziiertes Protein), ubiquitär, wurde mehrfach gefunden, Inserts umfassen gesamte CDS incl. 5'-UTR oder nur C-terminalen Teil	C-Terminus
Lysyl-Oxidase	Vermittelt Kollagen-Bindungen, sekretiertes Protein (kann in die Zelle zurückkehren), Interaktion mit der mittleren Region	C-Terminus
Galectin 3 (L-34, MAC-2)	Galectin-bindende Proteine	C-Terminus
CGI-51-Protein (human)		C-Terminus
Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type substrate (PTPNS)		C-Terminus
Galactose-bind. Lectin	Metastases-assoziiert, Interaktion mit seinem N-Terminus	C-Terminus
Poly(rC) bind. Protein 2	Interaktion mit seinem N-Terminus	C-Terminus
CCR4-NOT transcription complex, SU3		C-Terminus
Nidogen 1		C-Terminus
AT motif binding factor1 (Atbfl)	Interaktion mit seinem C-Terminus	C-Terminus

Tabelle 1: Auflistung der interessantesten Kandidaten für eine Protein-Protein-Interaktion mit Ror2, ermittelt im Yeast Two Hybrid Screen

Neben den in den Datenbanken ermittelten Interaktionspartnern (links) sind kurze Informationen zu den Proteinen (Mitte) und die interagierenden Domänen (Mitte, rechts) aufgeführt.

3.3.6 Verifizierung der positiven Klone aus dem Yeast Two Hybrid Screen mittels Co-Immunpräzipitation in Mammaliazellen

Die Interaktion von Proteinen im Yeast Two Hybrid Screen findet artifiziell im Hefe-Zellkern statt und zeigt demzufolge zwar eine prinzipielle physiologische Interaktionsfähigkeit von Proteindomänen in der Hefe auf, dies sind aber speziell bei der Untersuchung von Rezeptoren sehr unphysiologische Verhältnisse und lassen sich nicht zwangsläufig auf die ganzen Proteine bzw. auf die Verhältnisse in Mammalia-Zellen übertragen. Aus diesem Grund wurden einige aus dem Yeast Two Hybrid Screen als positiv für die Interaktion mit den N- bzw. C-terminalen Domänen von Ror2 hervorgegangenen Proteine einer Verifizierung mittels Co-Immunpräzipitation (Co-IP) unterzogen. Im speziellen handelt es sich bei diesen Proteinen um das gehirnspezifische, Prolin-reiche Protein Bprp, die Lysyl-Oxidase (Lox), Galectin 3 und Fibulin-5, wobei die ersten drei im Two Hybrid System eine Interaktion mit dem C-Terminus und das vierte mit dem N-Terminus von Ror2 aufweisen sollen.

Zu diesem Zweck wurden die vollständigen Sequenzen der Gene in den Datenbanken ermittelt und für die identifizierten Gene spezifische Primer konstruiert, die eine Amplifikation der kompletten Gensequenz mittels PCR aus einer cDNA-Bank ermöglichen. Bei dieser Gelegenheit wurden die Primer so konstruiert, dass die Gene am 3'-Ende um ein HA-Tag verlängert werden (für Lox: LYSYL OXIDASE MU/ LYSYL OXIDASE MU3; für Galectin 3: GALECTIN-3-3' HA-XHO/ GALECTIN-3-5' BAM HI; für Fibulin-5: FIBULIN 5 HA MU3/ FIBULIN 5 MU5; siehe Kapitel 6.1) oder für eine Ligation in den pCS3-Vektor geeignet sind (für Bprp: BPRP FWD/ BPRP REV; Ligation führt zu Myc-Tagging; siehe Kapitel 6.1). Die so gewonnene Inserts wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut, in die Mammalier-Expressionsvektoren pcDNA3 bzw. pCS3 ligiert, aufgereinigt und sequenziert (siehe Kapitel 2.1). Anschließend wurden Bprp, Lox, Galectin 3 und Fibulin-5 zusammen mit Ror2wt in HEK293T-Zellen transfiziert und co-exprimiert. Die Zellen wurden lysiert, der Zellextrakt abgenommen und Ror2 und die mit ihm interagierenden Proteine mit Protein G-Sepharose und Flag-Antikörpern gefällt (siehe Kapitel 2.5.2).

Die isolierten Proteine wurden über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, im Westernblot auf PVDF-Membranen transferiert und letztlich über Immunmarkierung charakterisiert (siehe Kapitel 2.4.21, 2.4.23 und 2.4.24).

Eine Interaktion von Ror2 mit Fibulin-5, Lox und Galectin 3 konnte in der Co-Immunpräzipitation nicht bestätigt werden, weil entweder die Expression der Proteine unterhalb der Nachweisgrenze lag oder die Proteine nicht co-präzipitiert werden konnten (Daten nicht gezeigt).

Bprp hingegen konnte in der Co-Immunpräzipitation als interagierender Faktor von Ror2 bestätigt werden. Ebenso zeigte sich erneut, dass offenbar der C-terminale Teil von Bprp für diese Interaktion ausreichend zu sein scheint, da neben der full length-Variante auch Bprp Δ N co-präzipitiert werden konnte (Abbildung 22 A).

Bprp ist ein Prolin-reiches Protein, das ursprünglich als Interaktionspartner der humanen RNA-bindenden DAZ (deleted in azoospermia)-Gen-Familie beschrieben wurde und im Lauf der Zeit unter verschiedenen Bezeichnungen in der Literatur auftaucht (DAZAP2 (DAZ-assoziiertes Protein 2), prtb (proline codon-rich transcript, brain expressed), Bprp (basic proline-rich protein)). Es wird ubiquitär exprimiert, besonders hohe Expressionsraten konnten allerdings im Gehirn, Herzen und Knochen beobachtet werden. Die Expression ist dabei in unterschiedlichen Zelltypen als Adhäsions-abhängig beschrieben worden.

Im Yeast Two Hybrid Screen wurde Bprp als Interaktionspartner des intrazellulären C-Terminus von Ror2 gefunden. Um die interagierenden Domänen näher zu charakterisieren, wurden verschiedene Ror2-Mutanten (neben Ror2wt, Ror2 Δ C und Ror2 Δ Tyr) in einem weiteren Co-Immunpräzitations-Experiment mit Bprp verwendet.

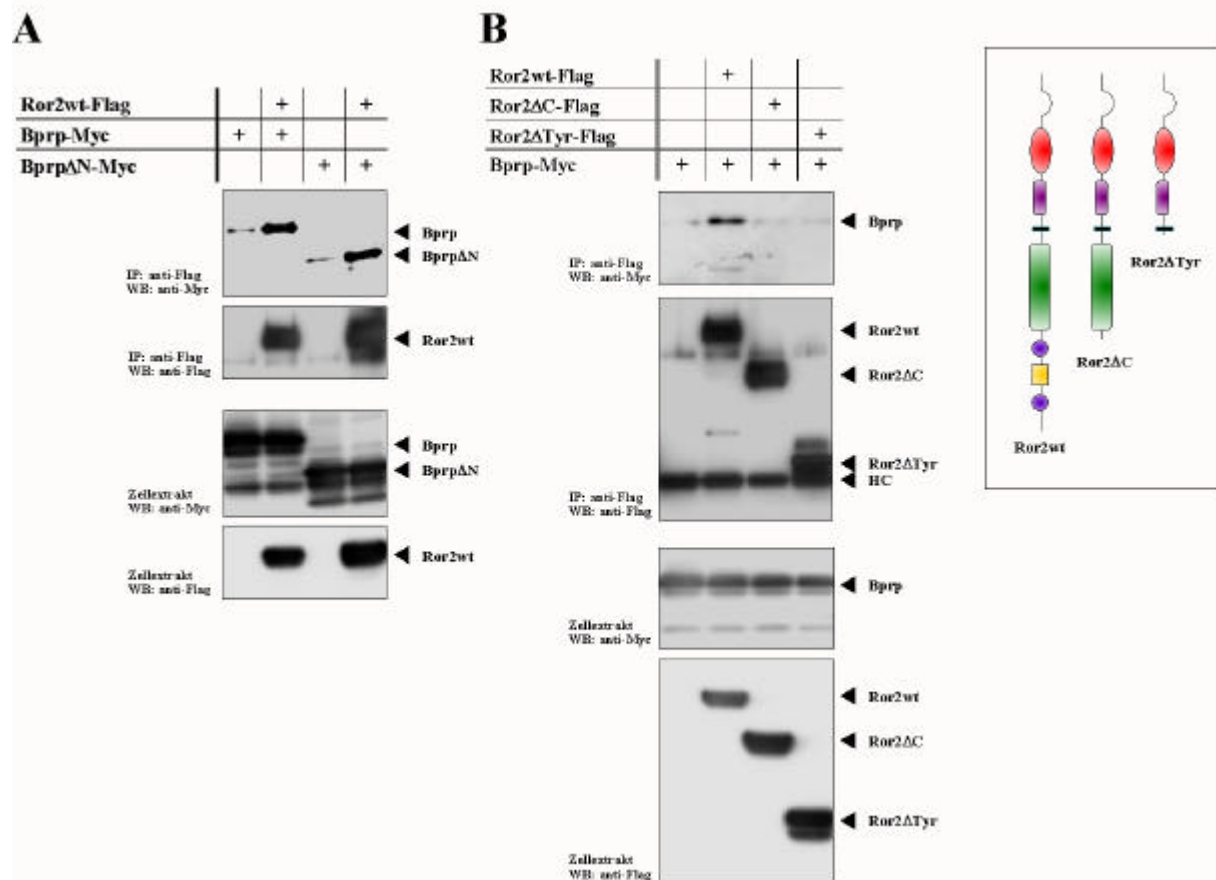


Abbildung 22: Ror2wt interagiert mit Bprp bzw. Bprp Δ N in der Co-IP, während Ror2 Δ C und Ror2 Δ Tyr dazu nicht in der Lage sind

Die Interaktion von Ror2wt mit Bprp und Bprp Δ N im Yeast Two Hybrid Screen kann in der Co-IP bestätigt werden (A); diese Interaktion ist abhängig von den C-terminalen Domänen von Ror2, da sowohl Ror2 Δ Tyr als auch Ror2 Δ C nicht mit Bprp interagieren (B); schematische Darstellung der verwendeten Ror2-Varianten (oben rechts)

Der Antikörperfärbung der Membranen ist zu entnehmen, dass Bprp ausschließlich mit dem intakten Protein Ror2wt in vollem Umfang zu interagieren vermag, die Interaktion mit den intrazellulären Deletionsmutanten Ror2 Δ C und Ror2 Δ Tyr jedoch stark eingeschränkt ist bzw. gar nicht mehr stattfindet (Abbildung 22B).

Daraus lässt sich der Schluss ziehen, dass Bprp ausschließlich mit der intrazellulären Domäne von Ror2wt und dabei insbesondere mit den Serin-/Threonin- und Prolin-reichen Sequenzen am C-terminalen Ende von Ror2 interagiert (Abbildung 23).

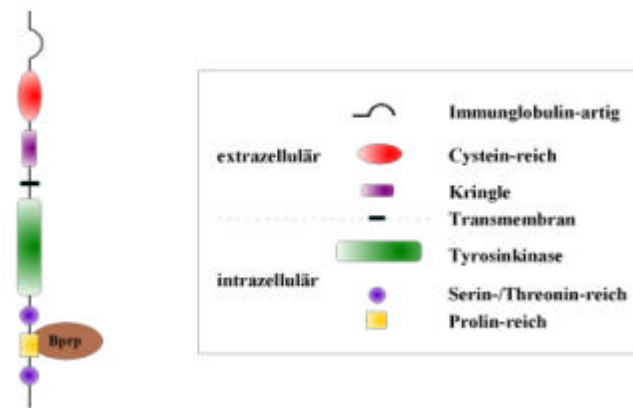


Abbildung 23: Schematische Darstellung der Interaktion zwischen Bprp und Ror2wt
Bprp interagiert mit Ror2 im Bereich von dessen c-terminalen Serin-/Threonin- und Prolin-reichen Domänen
Kasten: Graphische Darstellung der einzelnen Ror2-Domänen

3.3.7 Versuch der funktionellen Charakterisierung der Ror2-Bprp-Interaktion

Da die Überexpression von Ror2wt oder einer seiner Mutanten in HEK-Zellen keinerlei Einfluss auf die Aktivierung der untersuchten Signalmediatoren p38, JNK, ERK hat, stellt sich die Frage, in welchem Umfang eine zusätzliche Überexpression von Bprp als putativer intrazellulärer Mediator von Ror2 in der Lage ist, ein Signal auf einen dieser Signalwege zu übertragen.

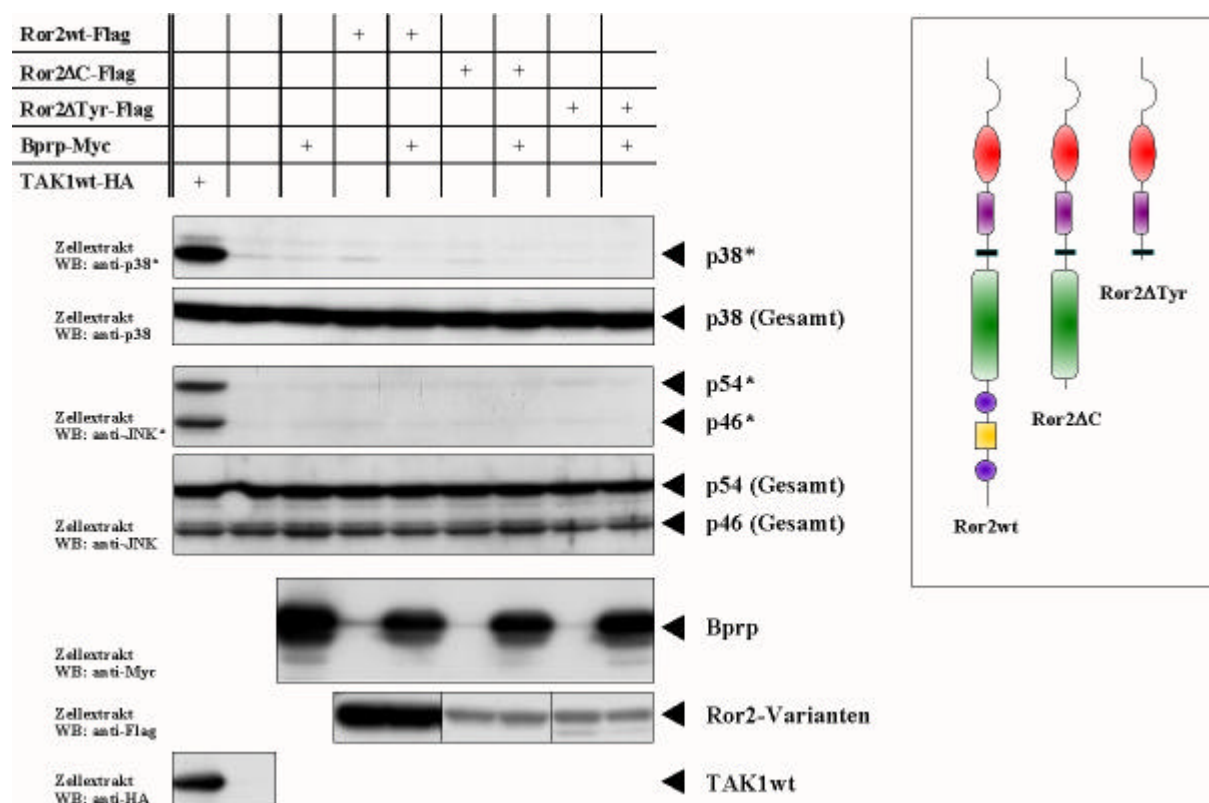


Abbildung 24: Transiente Co-Expression von Ror2-Varianten mit Bprp führt nicht zur Aktivierung der endogenen MAP-Kinasen p38 und JNK

Die Überexpression von Ror2wt, Ror2ΔC, und Ror2ΔTyr (Flag; schematische Darstellung oben rechts) und TAK1wt (HA; dient der Positivkontrolle) in den Zellextrakten kann durch die Immunfärbung von Westernblots mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen werden (untere Bilder); eine gleichbleibende Expression der zu untersuchenden Kinasen ist auch bei Überexpression der oben genannten Proteine gewährleistet und durch die Antikörperfärbung der Gesamtkinasen demonstriert; eine gesteigerte Phosphorylierung der untersuchten Kinasen konnte nur in Gegenwart der Positivkontrolle (TAK1wt) festgestellt werden (p38*, p54* und p46*).

In allen untersuchten Fällen kann weiterhin keine verstärkte Phosphorylierung, die anhand der Positivkontrolle - TAK1wt-Überexpression - zu sehen ist, festgestellt werden, was den Schluss zulässt, dass Ror2 auch im Zusammenspiel mit seinem intrazellulären Interaktionspartner Bprp keinen Einfluss auf einen der hier untersuchten Signalwege ausübt (Abbildung 24, für ERK sind die Daten nicht gezeigt). Die Co-Expression von Ror2 Δ C und Ror2 Δ Tyr wirkt sich dementsprechend auch nicht auf die Aktivierung der MAP-Kinasen aus.

3.4 Interaktion mit bereits bekannten Vertretern von Signalwegen der Osteo-/Chondrogenese

Parallel zum Yeast Two Hybrid Screen wurde auch in bekannten und gut untersuchten Signalwegen der Osteo-/Chondrogenese nach möglichen Interaktionspartnern von Ror2 gesucht.

3.4.1 Ror2 kann mit anderen Rezeptoren oligomerisieren

In der Arbeitsgruppe von Prof. S. Mundlos kam man nach verschiedenen Versuchen mit Ror2 zu der Überzeugung, dass Ror2 mit dem Liganden GDF5 (Growth and Differentiation Factor 5) interagiert (Daten nicht veröffentlicht). Diese Erkenntnisse führten zu der Hypothese, dass Ror2 in die TGF- β -Signalwege involviert ist.

In den TGF- β -Signalwegen kommt ein spezielles Prinzip der Signaltransduktion zum Einsatz, nämlich die Signalerkennung und -weiterleitung über heteromere Rezeptorkomplexe (d.h. das Zusammenspiel von zwei oder mehr unterschiedlichen Rezeptoren, um ein Signal weiterzuleiten, was ein höheres Maß an Diversität in den Signalwegen mit den gleichen beteiligten Proteinen zulässt). Im Fall der TGF- β -Signalwege besteht dieser Rezeptorkomplex in der Regel aus einem Heterotetramer aus zwei verschiedenen Rezeptoren (siehe Kapitel 1.3.1).

Wenn Ror2 in diese Rezeptorkomplexe eingebunden ist, sollte eine Interaktion mit anderen Vertretern dieser Rezeptor-Familien in einem Co-Immunpräzipitationsexperiment möglich sein. Neben den TGF- β -Signalwegen gibt es aber auch noch andere Signalwege, die sich auf osteo-/chondrogene Differenzierung von Zellen auswirken, wie z.B. die Signalwege, in die FGFRs eingebunden sind. Zu diesen Überlegungen passt es, dass Ror2 intrazellulär sowohl eine Tyrosinkinase-Domäne als auch Serin-/Threonin-reiche Domänen besitzt, die eine Assoziation sowohl mit Serin-/Threonin-Kinase-Rezeptoren als auch mit Tyrosin-Kinase-Rezeptoren plausibel erscheinen lassen.

Zur Gruppe der Tyrosin-Kinase-Rezeptoren gehören z.B. auch die FGFRs (Fibroblast Growth Factor Receptors). Der Einfluss von FGFRs und ihrer Liganden auf die Regulation des Knochenwachstums ist vielfach dokumentiert (Marie, 2003; siehe Kapitel 1.1.3). Neben den Parallelen in der Auswirkung auf die Osteo-/Chondrogenese und die intrazellulären Tyrosin-Kinase-Domänen verbinden Ror2 und FGFRs auch die extrazellulären Immunglobulin-artigen Domänen, die auf gemeinsame Liganden hindeuten könnten.

Typ I und Typ II-Rezeptoren der TGF- β -Signalwege hingegen gehören zur Gruppe der Serin-/Threonin-Kinase Rezeptoren und nehmen ebenfalls durch ihre Interaktion mit einer Vielzahl von Liganden Einfluss auf knochen- und knorpelbildende Prozesse. Eine größere Auswahl an verschiedenen TGF- β -Rezeptoren stehen aufgrund der Forschungen der letzten Jahre auf diesem Gebiet zur Verfügung.

3.4.1.1 *Co-Immunpräzipitation von Ror2wt mit unterschiedlichen Knochen-/Knorpel-spezifischen Rezeptoren*

In einem ersten Versuch wurde Ror2wt mit diversen Rezeptoren co-exprimiert und anschließend präzipitiert, um eine physiologische Interaktion mittels Antikörperfärbung nachzuweisen. Zu diesen Rezeptoren gehörten FGFR3, die dominant negative Variante von FGFR3 (dnFGFR3 = Deletion der intrazellulären Tyrosin-Kinase-Domäne) und konstitutiv aktive (ca) Varianten von TGF- β -Rezeptoren: Activin-Rezeptor I (alk2), BMP-Rezeptor IA (alk3), Activin-Rezeptor IB (alk4) und BMP-Rezeptor IB (alk6).

Die Färbungen zeigten, dass nahezu alle Rezeptoren eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Interaktion mit Ror2wt aufweisen (Daten nicht gezeigt):

Hierbei gilt es besonders die deutliche Interaktion von dnFGFR3 und FGFR3 nach der Immunpräzipitation hervorzuheben, aber auch ca alk2, 3 und 6 interagieren mit Ror2wt. Leider konnte das ca alk4 bereits in den Zellextrakten nicht nachgewiesen werden, da es aufgrund einer Fehlinformation nur ohne Tag zur Verfügung stand und direkte Antikörper gegen alk4 nicht vorhanden waren.

Aufgrund der überraschend vielen Interaktionspartner von Ror2wt in der Co-IP stellt sich die Frage nach der Glaubwürdigkeit dieser Ergebnisse. Ist es möglich, dass in der Co-IP falsch-positive Interaktionen angezeigt werden? Dies ist z.B. denkbar, wenn durch unvollständige Lyse Membranfragmente entstehen. In so einem Fall könnten dann allein durch die räumliche Nähe zu Ror2wt auch die co-transfizierten Rezeptoren präzipitiert werden, ohne dass eine direkte Interaktion zwischen den Rezeptoren stattfindet.

Um diesen methodischen Fehler auszuschließen, wurde eine Ror2-Variante generiert, die lediglich aus dem löslichen intrazellulären Teil von Ror2 besteht (Ror2Cterm). Eine solche Mutante wäre nicht länger an die Membran gebunden, läge stattdessen löslich im Cytoplasma vor und könnte demzufolge nicht allein aufgrund einer möglichen räumlichen Nähe andere Rezeptoren co-präzipitieren, sondern nur Interaktionspartner, die mit den intrazellulären Domänen von Ror2 interagieren. Dies bedeutet allerdings gleichzeitig, dass auch eventuell vorliegende Liganden-vermittelte Bindungen nicht mehr zustande kommen.

3.4.1.2 *Herstellung eines löslichen intrazellulären Ror2-Rezeptors und Klonierung in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3*

Zur Generierung einer Ror2-Mutante, die ausschließlich aus den intrazellulären Domänen besteht und deren extrazelluläre und Transmembran-Domänen fehlen, wurde der intrazelluläre Teil von Ror2 mittels der Primer ROR2-CTERM1 FWD und ROR2-CTERM1 REV amplifiziert (verwendete Polymerase: Herculase von STRATAGENE), mit den Restriktionsenzymen XbaI und BamHI gespalten, phenolisiert und aufgereinigt.

Das erhaltene Ror2Cterm-Konstrukt wurde in den mit XbaI/BamHI-geschnittenen, dephosphorylierten pcDNA3-Vektor (siehe Kapitel 2.1) kloniert. Ein Aliquot des Ligationsproduktes wurde in E.coli SURE transformiert. Die Bakterien wurden auf Ampicillin-Agarplatten in verschiedenen Volumina ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Anschließend wurden einzelne Kolonien in einem PCR-Ansatz mit vektorspezifischen und genspezifischen Primern (ROR INT2 FWD und SP6 PCDNA REV) übertragen und eine PCR zum Nachweis rekombinanter Bakterienklone durchgeführt (siehe Kapitel 2.1 und 2.3).

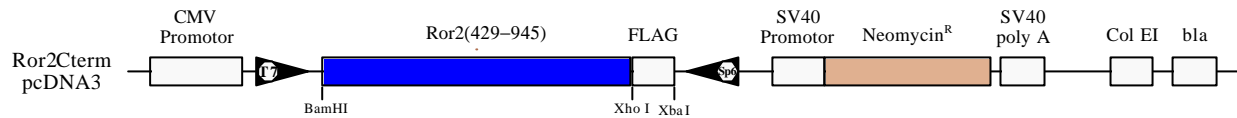


Abbildung 25: Ror2Cterm kloniert in pcDNA3-Vektor (CMV = Cytomegalie-Virus; SV40 = Simian-Virus 40; Col EI = origin of replication; bla = β -Lactamase (verantwortlich für die Ampicillin-Resistenz))

Hieraus wurden die Plasmide isoliert und unter Zuhilfenahme geeigneter Primer (T7 PCDNA FWD, ROR INT1 FWD, ROR INT2 FWD, ROR INT3 FWD; siehe Kapitel 6.1) das komplette Insert einschließlich der angrenzenden Vektorregionen durchsequenziert, um Fehler bei der Synthese der Ror2Cterm-Mutante oder bei der Restriktion/Ligation ausschließen zu können. Mittels des Programm SeqMan (DNASTAR Inc.) konnten die erhaltenen Sequenzen mit den bekannten Ror2wt- und pcDNA3-Sequenzen verglichen werden.

3.4.1.3 Co-Immunpräzipitation von Ror2Cterm mit unterschiedlichen Knochen-/Knorpel-spezifischen Rezeptoren

Mit der neu generierten Mutante Ror2Cterm wurde der vorangegangene Versuch wiederholt. Als putative Interaktionspartner wurden FGFR3, FGFR2 und die konstitutiv aktiven Varianten von alk2, -3, -4, -5 und -6 (ca alk2, -3, -4, -5 und -6; alk5 steht für TGF- β -Rezeptor I) co-exprimiert.

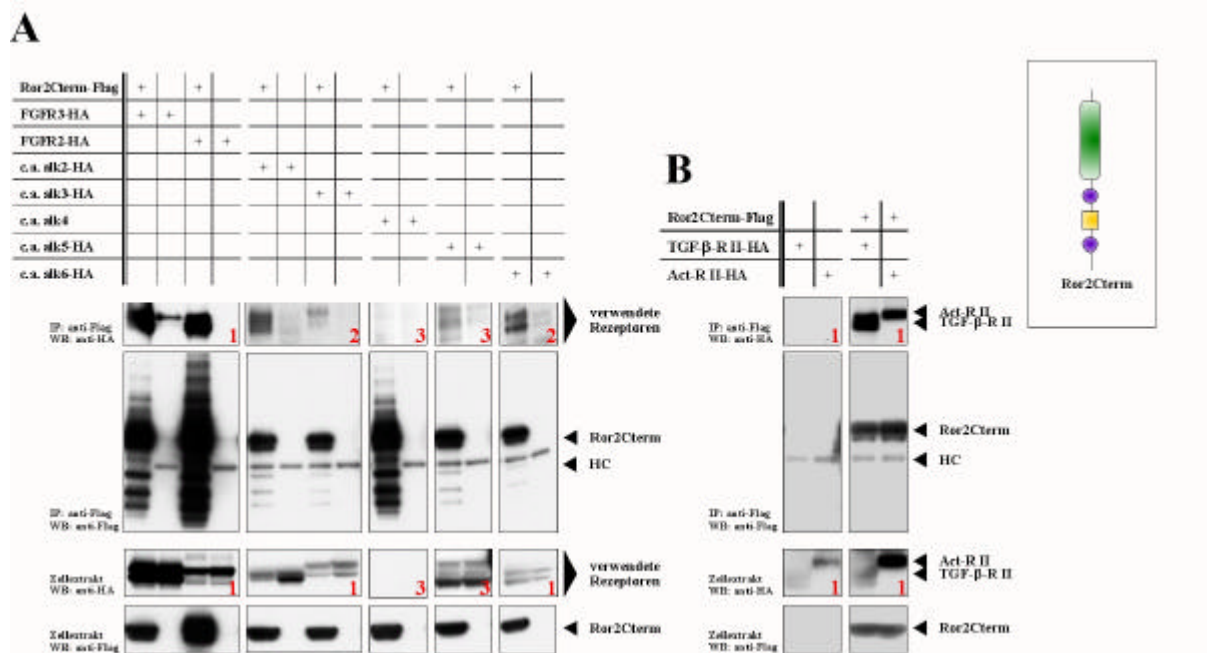


Abbildung 26: Ror2 interagiert mit anderen Rezeptoren über seine C-terminalen Domänen

Die Co-Expression von Ror2-Cterm (Flag-markiert; schematische Darstellung im Kasten) mit verschiedenen Rezeptoren (HA-markiert; FGFR3, FGFR2, ca alk2, -3, -4, -5 oder -6 (Bild A) bzw. TGF- β -R II oder Act-R II (Bild B)) in den Zellextrakten kann durch die Immunfärbung von Westernblots mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen werden (untere Bilder). In den oberen Bildern sind das immunpräzipitierte Ror2Cterm und die co-präzipitierten Rezeptoren (sehr starke Banden: FGFR3, FGFR2, TGF- β -R II und Act-R II (Bilder A und B); mittelstarke Banden: ca alk2 und ca alk6 (Bild A); schwache Banden: ca alk3 und ca alk5 (Bild A); keine Banden: ca alk4 (Bild A)) sichtbar. Bei der Interpretation sind die unterschiedlichen Belichtungszeiten (1 = 30 sec; 2 = 5 min; 3 = 1 h 30 min) und die Tatsache, dass ca alk4 nur ohne Tag vorliegt und demzufolge nicht nachgewiesen werden kann, zu berücksichtigen. Eine deutliche Degradation von Ror2Cterm ist in Gegenwart von FGFR3, FGFR2 und ca alk4 zu beobachten (Bild A).

Auch in diesem Experiment (Abbildung 26 A) zeigt sich, dass vor allem die FGFRs (FGFR2 und FGFR3) sehr stark mit Ror2 interagieren können. Neben diesen bereits nach kurzer Belichtungszeit auf den Röntgenfilmen nachweisbaren co-präzipitierten Proteinen (1 = 30 sec) kann außerdem auch eine starke Molekulargewichtsveränderung zu höher molekularen als auch zu niedermolekularen Varianten von Ror2Cterm in den Proben, in denen es mit den FGFRs co-exprimiert worden ist, beobachtet werden. Eine vergleichbare Modifikation tritt ebenfalls in der Gegenwart von ca alk4 auf, welches aufgrund der oben genannten Gründe nicht auf direkte Weise nachgewiesen werden kann. Die beobachtete Modifikation könnte allerdings einen Hinweis auf eine ähnlich starke Interaktion von Ror2Cterm mit ca alk4 wie mit den FGFRs geben. Die Interaktion von Ror2Cterm mit den Rezeptoren ca alk2, 3 und 6 ist wesentlich schwächer ausgeprägt und konnte erst nach deutlich längerer Belichtung dokumentiert werden (2 = 5 min), was nicht allein auf die etwas schwächere Expression zurückzuführen ist. Im Fall von ca alk5 hingegen war die Expression bereits sehr gering und demzufolge konnte auch erst nach sehr langer Belichtung eine schwache Interaktion dargestellt werden (3 = 1 h 30 min). Hinzu kommt, dass die nur schwach interagierenden Rezeptoren im Gegensatz zu den stark interagierenden Rezeptoren FGFR2 und FGFR3 (und eventuell auch ca alk4) keine Modifikationsmuster von Ror2Cterm erzeugen.

In einem weiteren Experiment (Abbildung 26 B) wurde das Spektrum an Rezeptoren um die Typ II-Rezeptoren der TGF- β -Familie TGF- β -R II (TGF- β -Rezeptor II) und Act-R II (Activin-Rezeptor II) erweitert. Auch hier konnte eine sehr starke Interaktion von Ror2Cterm mit beiden Rezeptoren dokumentiert werden. Im Gegensatz zu FGFR3 und FGFR2 geht diese starke Interaktion allerdings nicht einher mit einer verstärkten Modifikation von Ror2Cterm.

Die starke Interaktionsfähigkeit mit weiterhin recht unterschiedlichen Rezeptoren lässt entweder darauf schließen, dass Ror2 eine sehr unspezifische Rolle in der Signalvermittlung einnimmt (z.B. als eine Art Adapter oder Co-Rezeptor) oder das generierte Ror2Cterm aufgrund seiner cytoplasmatischen Löslichkeit Ror2-untypisch sehr unspezifische Bindungen mit Rezeptorkinasen eingeht, die normalerweise durch die Membranständigkeit oder aber die Interaktion mit Liganden reguliert wird. Eine besondere Präferenz für den Typ I-Rezeptor, der mit GDF5 in Verbindung gebracht wird (alk6), konnte in diesen Co-Immunpräzipitationsexperimenten mit Ror2Cterm nicht bestätigt werden.

Die Interaktion von FGFR2 oder FGFR3 mit Ror2 im Hinblick auf die embryonale Entwicklung des Knochen- und Knorpelsystems wird derzeit anhand der Kreuzung von entsprechenden knock-out Mäusen in vivo durch die Arbeitsgruppe um Prof. S. Mundlos untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen liegen noch nicht vor.

Da eine Spezifität für einen untersuchten Signalweg über Interaktion mit Rezeptoren nicht festgestellt werden konnte, wurde das Interesse auf die Untersuchung der Interaktion mit intrazellulären Signalmediatoren verstärkt.

3.4.2 Interaktion mit Signalmediatoren

Im Rahmen von Untersuchungen, die sich mit der MAP3K TAK1 und seinen spezifischen Interaktionspartnern in der Co-Immunpräzipitation beschäftigten, wurde auch die Interaktion von Bprp mit TAK1wt dokumentiert (unveröffentlichte Daten von A. Hoffmann).

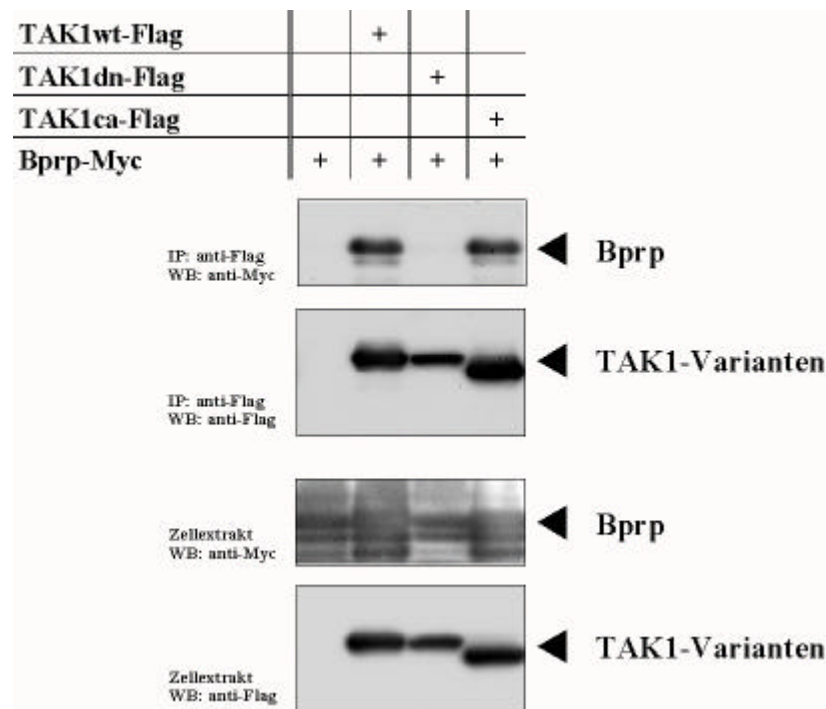


Abbildung 27: Aktives TAK1 interagiert mit Bprp

Die Co-Expression von verschiedenen TAK1-Varianten (Flag-markiert; TAK1wt, TAK1dn (dominant negative Variante von TAK1), TAK1ca (konstitutiv aktive Variante von TAK1)) und Bprp (Myc-markiert) in den Zellextrakten kann durch die Immunfärbung von Westernblots mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen werden (untere Bilder). In den oberen Bildern sind die immunpräzipitierten TAK1-Varianten und das co-präzipitierte Bprp (bei Verwendung von TAK1wt und TAK1ca) sichtbar. Es findet keine erkennbare Interaktion mit TAK1dn statt.

Zusätzlich zu der Beobachtung, dass Bprp in der Lage ist, mit TAK1wt zu interagieren, konnte auch die Abhängigkeit dieser Interaktion von der Kinaseaktivität von TAK1 demonstriert werden (siehe Abbildung 27). Eine Interaktion findet nur dann statt, wenn entweder TAK1wt oder TAK1ca co-exprimiert werden (die konstitutiv aktive Variante von TAK1 zeichnet sich dadurch aus, dass durch das Fehlen der ersten 22 Aminosäuren am N-Terminus die Kinase-Aktivität nicht mehr reguliert werden kann). Ein Unterschied zwischen TAK1wt und der konstitutiv aktiven Variante kann nicht festgestellt werden, da TAK1 im überexprimierten Zustand offensichtlich bereits aktiviert wird und nicht auf die Aktivierung durch andere Faktoren angewiesen ist (eingereichte Veröffentlichung von A. Hoffmann: TGF- β -activated kinase-1 (TAK1), a MAP3K, interacts with Smad proteins and interferes with osteogenesis in murine mesenchymal progenitors). Im Gegensatz dazu zeigt TAK1dn keine Interaktion mit Bprp: die dominant negative Variante von TAK1 zeichnet sich durch den Austausch von einer Aminosäure in der Position 63 der ATP-Bindungsstelle (Tryptophan statt Lysin) aus.

TAK1 (TGF- β -aktivierte Kinase) in seiner Funktion als Signalmediator sowohl von Signalwegen der Differenzierung als auch der Inflammation wird seit geraumer Zeit in unserer Arbeitsgruppe untersucht. Es handelt sich hierbei um eine MAP3Kinase (mitogen aktivierte Proteinkinase-Kinase-Kinase), die eine zentrale Position vor allem in inflammatorischen sowie TGF- β - und Wnt-Signalwegen einnimmt, von unterschiedlichen

Ligand-Rezeptor-Interaktionen in ihrer Aktivität beeinflusst wird und ihrerseits verschiedene nachgeschaltete Kinasen phosphorylieren kann (siehe Kapitel 1.3.2).

Die bereits beschriebene Interaktion zwischen Ror2 und Bprp (siehe Kapitel 3.3.5 und 3.3.6) auf der einen und Bprp und TAK1 auf der anderen Seite veranlasste uns zur Prüfung der Interaktion von Ror2 und TAK1 mittels Co-Immunpräzipitation in HEK293-Zellen, um auf diese Weise eine Verbindung von Ror2 mit den MAP-Kinase-Signalwegen herstellen zu können.

3.4.2.1 Die MAP3Kinase TAK1 interagiert mit Ror2

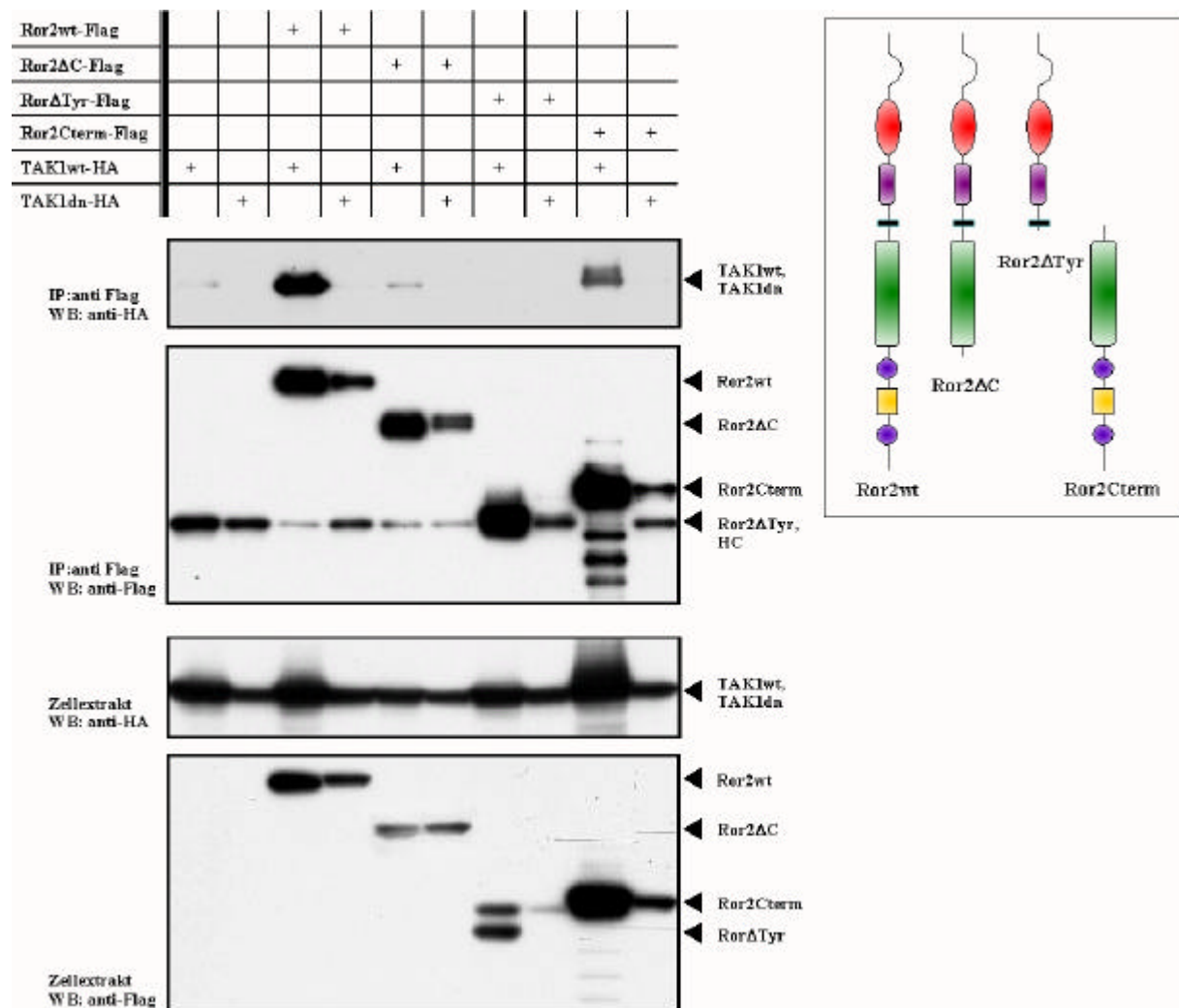


Abbildung 28: Aktives TAK1 interagiert mit Ror2wt und Ror2Cterm

Die Co-Expression von verschiedenen Ror2-Varianten (Flag-markiert; schematische Darstellung im Kasten) und TAK1-Varianten (HA-markiert; TAK1wt, TAK1dn) in den Zellextrakten kann durch die Immunfärbung von Westernblots mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen werden (untere Bilder). In den oberen Bildern sind die immunpräzipitierten Ror2-Varianten und das co-präzipitierte TAK1wt (bei Verwendung von Ror2wt und Ror2Cterm) sichtbar. Es findet keine erkennbare Interaktion mit TAK1dn statt (oberste Abbildung).

Die Co-Expression von Ror2wt mit TAK1wt oder TAK1dn zeigt in der Co-Immunpräzipitation eine starke Interaktion von Ror2wt mit TAK1wt. Im Gegensatz dazu findet zwischen dem dominant negativen TAK1 (TAK1dn) und Ror2wt keine Interaktion statt (Abbildung 28). Für die Interaktion von TAK1 mit Ror2 ist demzufolge die aktive Form von TAK1 erforderlich.

Um die Domänen von Ror2, die an dieser Interaktion beteiligt sind, näher zu charakterisieren, wurden parallel zur Ror2wt-Expression auch andere Ror2-Varianten in diesen Co-Immunpräzipitationen mit TAK1wt und TAK1dn verwendet. Dabei konnte beobachtet werden, dass TAK1wt nur mit Ror2wt und dem intrazellulären Teil von Ror2 (in Form der löslichen, cytoplasmatisch exprimierten Mutante Ror2Cterm) interagiert, während die intrazellulären Deletionsmutanten Ror2 Δ C und Ror2 Δ Tyr keine Interaktion mit TAK1wt aufweisen (Abbildung 28). Daraus lässt sich ableiten, dass die C-terminalen Serin-/Threonin- und Prolin-reichen Sequenzen von Ror2 für eine Interaktion von Ror2 mit TAK1 notwendig sind.

Zur weiteren Charakterisierung dieser Interaktion von Ror2 mit TAK1 wurden die beiden Interaktionspartner in die Vektoren pGBKT7 und pACT2 umklontiert und in einem Yeast Two Hybrid System getestet (siehe Kapitel 3.3). Wegen der artifiziellen Interaktion im Zellkern der Hefe ist die Präsenz von zusätzlichen „endogenen“ akzessorischen Faktoren in diesem System unwahrscheinlich. Eine positive Reaktion erhöht damit die Wahrscheinlichkeit einer direkten Interaktion der zu untersuchenden Faktoren. Im Gegensatz zu den Interaktionspartnern Bprp und Ror2 konnte sowohl zwischen Bprp und TAK1 als auch zwischen Ror2 und TAK1 keine Interaktion festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass endogene Komponenten aus HEK-Zellen eine Co-IP dieser Faktoren erst ermöglichen (Abbildung 29).

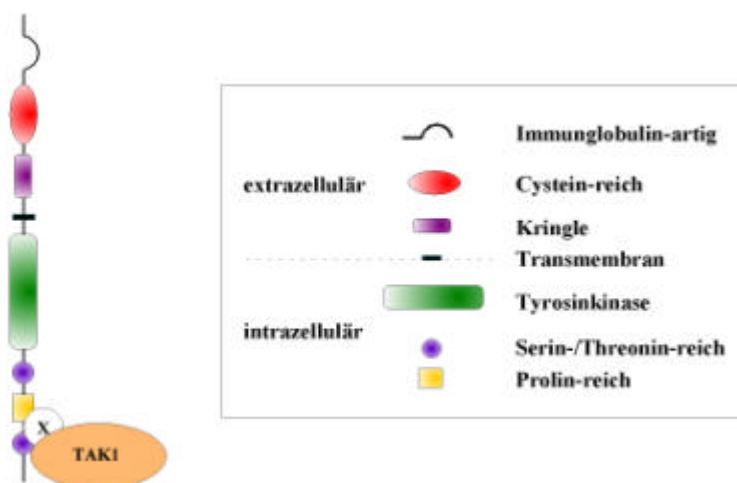


Abbildung 29: Schematische Darstellung der Interaktion zwischen TAK1 und Ror2wt
TAK1wt interagiert über endogene Komponenten (X) mit Ror2 im Bereich von dessen c-terminalen Serin-/Threonin- und Prolin-reichen Domänen

Kasten: Graphische Darstellung der einzelnen Ror2-Domänen

3.4.2.2 TAK1-Bindung an Ror2 interferiert nicht mit der Bindung von Bprp an Ror2

Betrachtet man diese Ergebnisse vor dem Hintergrund der „direkten“ Bprp/Ror2-Interaktion im Bereich der Serin-/Threonin- und Prolin-reichen Domänen von Ror2 (siehe Kapitel 3.3.6), stellt sich die Frage, ob diese drei Interaktionspartner (Ror2, Bprp und TAK1) miteinander einen multimeren Komplex bilden oder aber insbesondere für das relativ kleine Bprp-Protein, das sowohl mit Ror2 als auch mit TAK1 interagieren kann, nur die Ausbildung binärer Komplexe möglich ist.

Eine Co-Expression aller drei oben beschriebenen Partner in einem weiteren Experiment sollte darüber Aufschluss geben. Hierzu wurden erneut mehrere Ror2-Varianten eingesetzt.

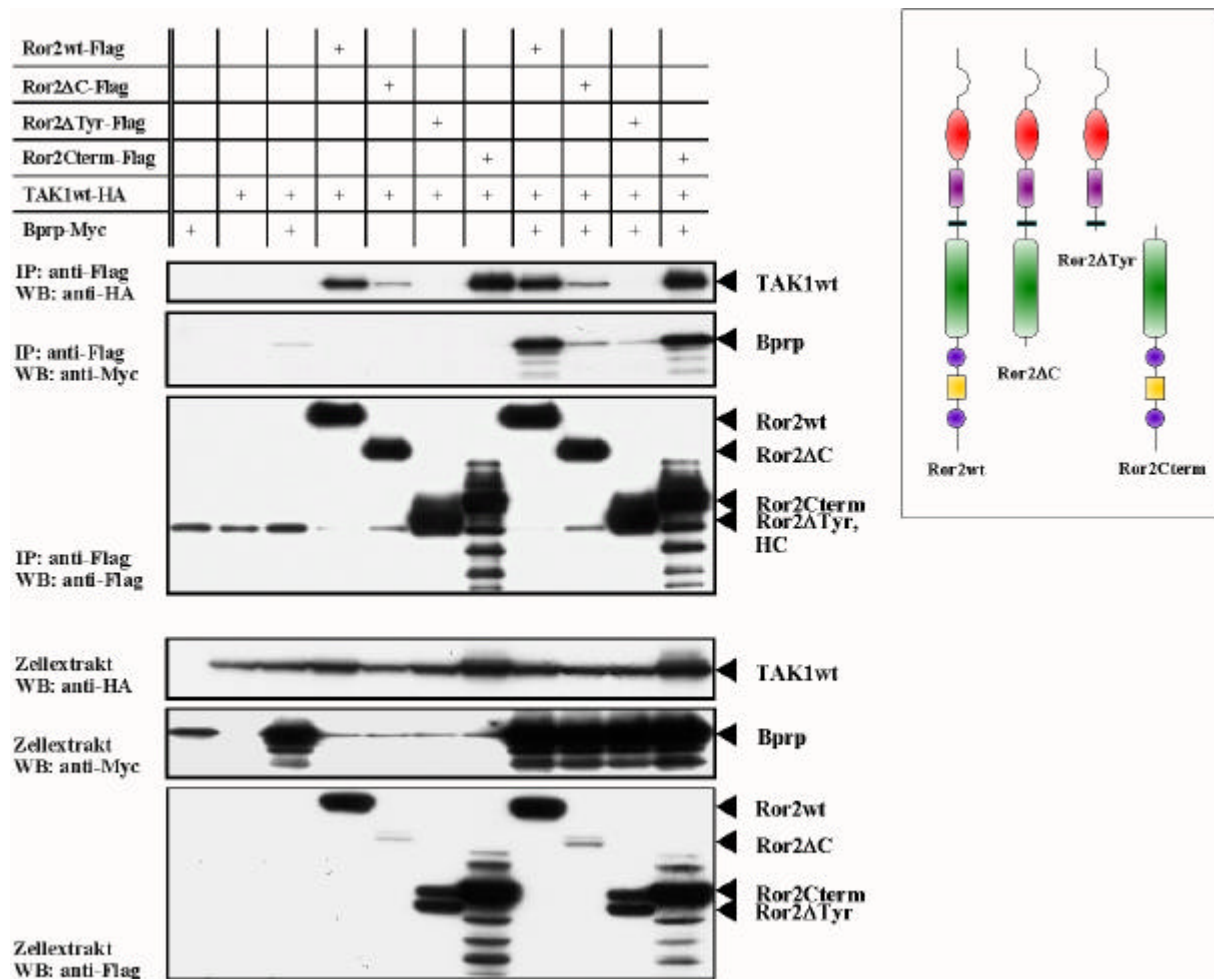


Abbildung 30: TAK1-Bindung an Ror2 interferiert nicht mit der Bindung von Bprp an Ror2

Die Co-Expression von verschiedenen Ror2-Varianten (Flag-markiert; schematische Darstellung im Kasten), TAK1wt (HA-markiert) und Bprp (Myc-markiert) in den Zellextrakten kann durch die Immunfärbung von Westernblots mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen werden (untere Bilder). In den oberen Bildern sind die immunpräzipitierten Ror2-Varianten und das co-präzipitierte TAK1wt sowie Bprp (bei Verwendung von Ror2wt und Ror2Cterm) sichtbar. Inhibitorische oder die Bindung fördernde Auswirkungen durch die zusätzliche Expression von Bprp konnten nicht festgestellt werden.

Die Westernblots der Co-Immunpräzipitation belegen, dass die Interaktion von TAK1wt sowohl mit Ror2wt als auch mit Ror2Cterm nicht durch die Gegenwart von Bprp in seiner Intensität gestört oder gefördert wird. Außerdem kann keine Inhibierung der Ror2/Bprp-Interaktion durch die Gegenwart von TAK1wt festgestellt werden. Die Deletionsmutanten Ror2ΔC und Ror2ΔTyr weisen erneut keine Interaktion mit TAK1wt und/oder Bprp auf (Abbildung 30). Demzufolge können sowohl Bprp als auch TAK1wt unabhängig voneinander und gleichzeitig am C-terminalen Bereich von Ror2 binden (Abbildung 31).

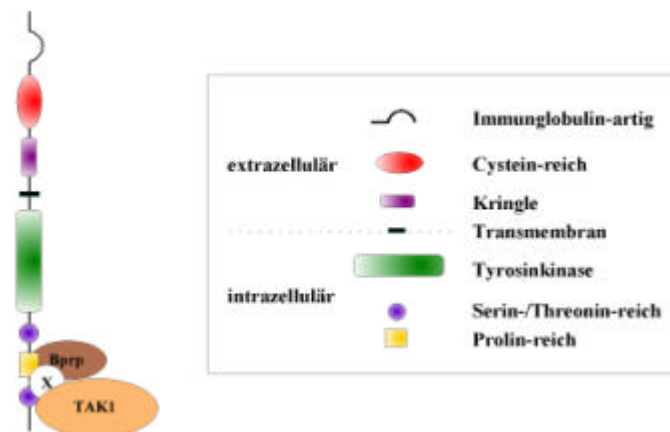


Abbildung 31: Schematische Darstellung der Interaktion von TAK1 und Bprp mit Ror2wt
Bprp und TAK1wt binden unabhängig voneinander und gleichzeitig am C-terminalen Bereich von Ror2.
Kasten: Graphische Darstellung der einzelnen Ror2-Domänen

3.4.2.3 Die Ror2-TAK1-Interaktion führt nicht zu einer Veränderung in der Aktivität von MAPKinase-Signalwegen

Ein Blick auf das Aktivierungsverhalten unterschiedlicher MAP-Kinase-Signalwege, die bereits durch TAK1wt-Überexpression allein aktiviert werden (siehe Kapitel 3.1.1 und 3.3.7), in der Gegenwart von Ror2 könnte Aufschluss darüber geben, ob Ror2 einen positiven oder negativen Einfluss auf die durch TAK1wt vermittelte Aktivierung dieser Signalwege besitzt.

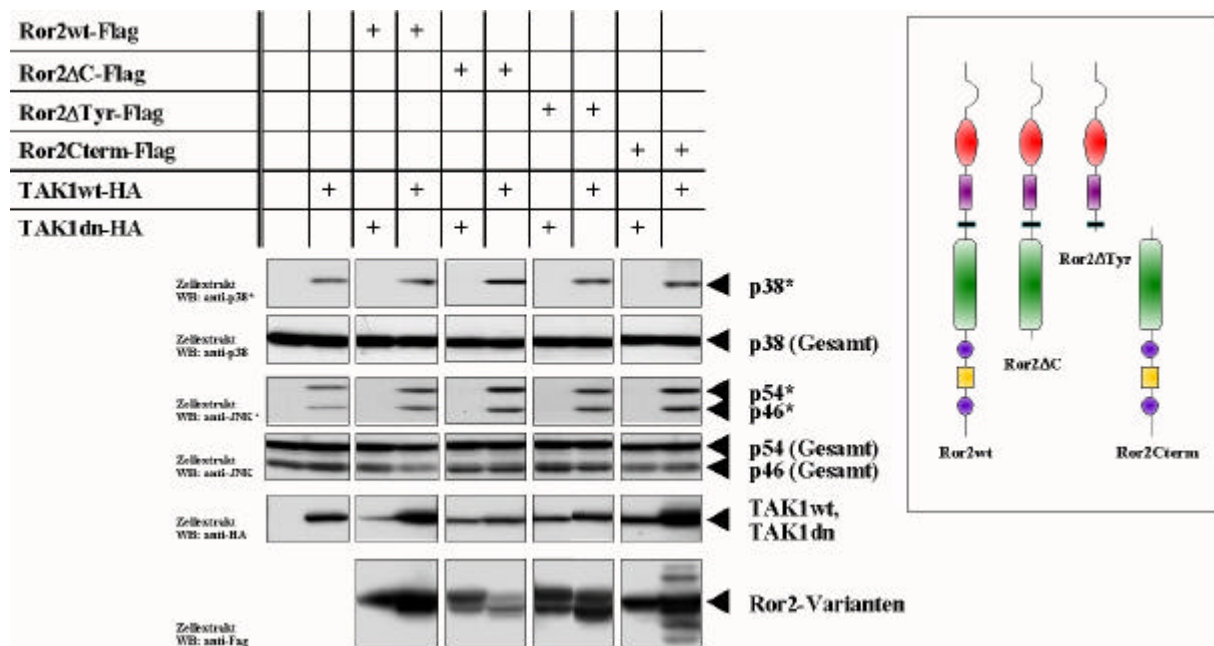


Abbildung 32: Die Co-Expression von Ror2-Varianten führt nicht zu einer Änderung in der TAK1-abhängigen Phosphorylierung der endogenen MAP-Kinasen p38 oder JNK

Die Co-Expression von Ror2wt, Ror2 Δ C oder Ror2 Δ Tyr (Flag-markiert; schematische Darstellung im Kasten) mit TAK1wt oder TAK1dn (HA-markiert) in den Zellextrakten kann durch die Immunfärbung von Westernblots mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen werden (untere Bilder); eine gleichbleibende Expression der zu untersuchenden Kinasen ist auch bei Überexpression der oben genannten Proteine gewährleistet und durch die Antikörperfärbung der Gesamtkinasen demonstriert; eine gesteigerte Phosphorylierung der untersuchten Kinasen gegenüber der Positivkontrolle (TAK1wt allein) bedingt durch die Aktivität der Ror2-Varianten konnte nicht festgestellt werden (obere Bilder; p38*, p54* und p46*)

Die basale Phosphorylierung verschiedener Kinasen (p38, JNK, ERK) durch die TAK1wt-Überexpression (sichtbar gemacht durch spezielle Phosphorylierungsantikörper, die spezifisch nur die phosphorylierten Kinasen erkennen) kann durch zusätzliche Überexpression von Ror2wt oder einer seiner Mutanten nicht stimuliert bzw. inhibiert werden (Abbildung 32). Ein eventuell sehr schwach ausfallender Effekt, resultierend aus der Interaktion zwischen Ror2 und TAK1 wäre in diesem System allerdings nicht erkennbar, da die Überexpression von TAK1wt allein schon zu einer starken Aktivierung der nachgeschalteten MAPKinasen führt. Gleiches gilt auch in der zusätzlichen Gegenwart von Bprp (Daten nicht gezeigt). Daraus muss man den Schluss ziehen, dass die Interaktion von Ror2 mit TAK1wt und/oder Bprp keinerlei Einfluss auf die hier untersuchten TAK1-abhängigen Signalwege ausübt.

Allerdings konnten in der Co-Immunpräzipitation verschiedene andere Effekte beobachtet werden, die im direkten Zusammenhang mit einer Ror2-TAK1-Interaktion stehen:

3.4.2.4 TAK1 phosphoryliert Ror2

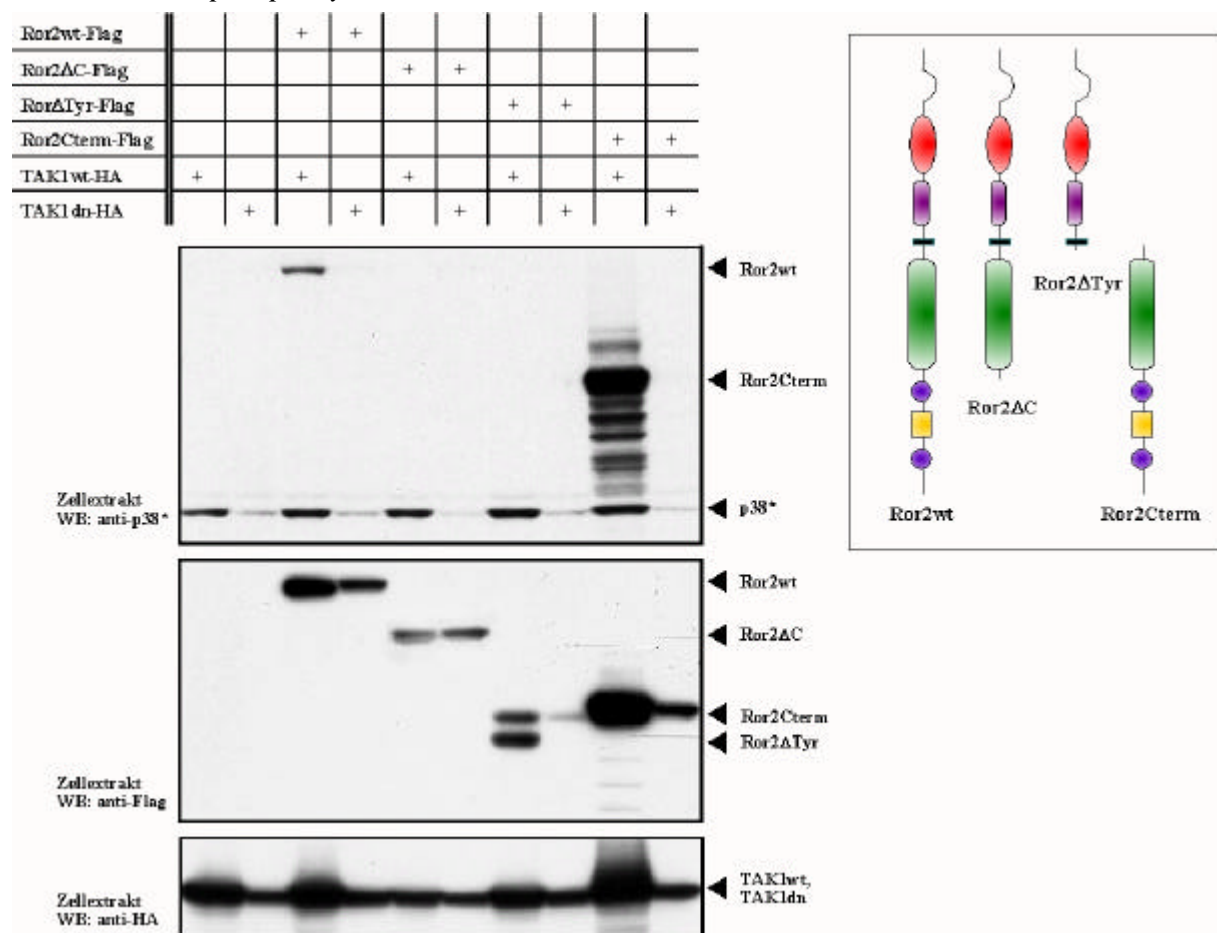


Abbildung 33: Nachweis von Ror2wt und Ror2Cterm mit dem p38*-Antikörper

Die Co-Expression von Ror2wt, Ror2ΔC, Ror2ΔTyr oder Ror2Cterm (Flag-markiert; schematische Darstellung im Kasten) mit TAK1wt oder TAK1dn (HA-markiert) in den Zellextrakten kann durch die Immunfärbung von Westernblots mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen werden (untere Bilder); im obersten Bild wird durch den p38*-Antikörper in Anwesenheit von TAK1wt das doppelt-phosphorylierte p38 detektiert. Zusätzlich werden bei gleichzeitiger Expression von TAK1wt durch diesen Antikörper auch Proteine erkannt, deren Massengewicht mit dem der verwendeten Ror2-Varianten übereinstimmt (Ror2wt und Ror2Cterm). Dieses Phänomen kann mit den Varianten Ror2ΔC und Ror2ΔTyr und in Gegenwart von TAK1dn nicht beobachtet werden.

Im Rahmen der Untersuchungen von MAPKinase-Signalwegen und ihrer Aktivitäten in Gegenwart von TAK1 und/oder Ror2 wurden bei der Färbung der Westernblots mit phosphorylierungsspezifischen p38-Antikörpern neben dem phosphorylierten p38 (p38*) auch Banden gefärbt, die in ihrer Größe mit den verwendeten Ror2-Konstrukten übereinstimmten (Abbildung 33).

Diese Banden traten spezifisch nur dann auf, wenn entweder Ror2wt oder Ror2Cterm und gleichzeitig TAK1wt exprimiert wurden. Die Co-Expression von Ror2 Δ C oder Ror2 Δ Tyr, die nicht mit TAK1wt interagieren, mit TAK1wt führte ebenso wenig zu einer Färbung in der entsprechenden Größe wie die Co-Expression der vier Ror-Varianten mit TAK1dn.

Diese Beobachtungen ließen sich dadurch erklären, dass die Antikörper, die gegen eine kurze Peptidsequenz mit zwei phosphorylierten Aminosäuren (...T*GY*...) gerichtet sind, spezifisch nicht nur doppelt-phosphoryliertes p38, sondern auch phosphoryliertes Ror2 binden können. Diese Phosphorylierung von Ror2 ist dabei abhängig von der Gegenwart von aktivem TAK1 und den intrazellulären Ror2-Domänen.

Auf die Erkennungssequenz des p38*-Antikörpers (...T*GY*...) hin untersucht, konnten in Ror2 zwei TGY-Motive gefunden werden, von denen das eine im extrazellulären Bereich und das andere in der terminalen Serin-/Threonin-reichen Domäne liegt (TAK1-interagierender Bereich). Das extrazellulär positionierte TGY-Motif kann bei den weiteren Untersuchungen vernachlässigt werden, da eine Interaktion mit TAK1wt in diesem Bereich nicht stattfindet.

Für eine Bestätigung der Hypothese, dass in Folge der Interaktion von aktivem TAK1 mit den C-terminalen Domänen von Ror2 das TGY-Motif innerhalb der terminalen Serin-/Threonin-reichen Domäne phosphoryliert wird, sollten Ror2-Punktmutanten auf ihre Bindungsaffinität zum p38*-Antikörper untersucht werden:

Zu diesem Zweck wurden bei Ror2 durch Punktmutation gezielt die für die Phosphorylierung relevanten Aminosäuren 871 Threonin und/oder 873 Tyrosin des TGY-Motifs gegen Alanin ausgetauscht, um auf diese Weise eine partielle oder doppelte Phosphorylierung zu unterdrücken, ohne die physische Interaktion mit TAK1wt zu beeinträchtigen. Dabei wurden mit Hilfe von entsprechenden Oligonukleotiden (ROR2T871A FWD und ROR2T871A REV für Ror2T871A; ROR2Y873A FWD und ROR2Y873A REV für Ror2Y873A; ROR2T871A/Y873A FWD und ROR2T871A/Y873A REV für Ror2T871A/Y873A; siehe Kapitel 6.1) mutierte DNA-Stränge synthetisiert, später die parental, methylierten Stränge durch das Restriktionsenzym Dpn I abgebaut und die mutierten Plasmide vermehrt (siehe Kapitel 2.1.9).

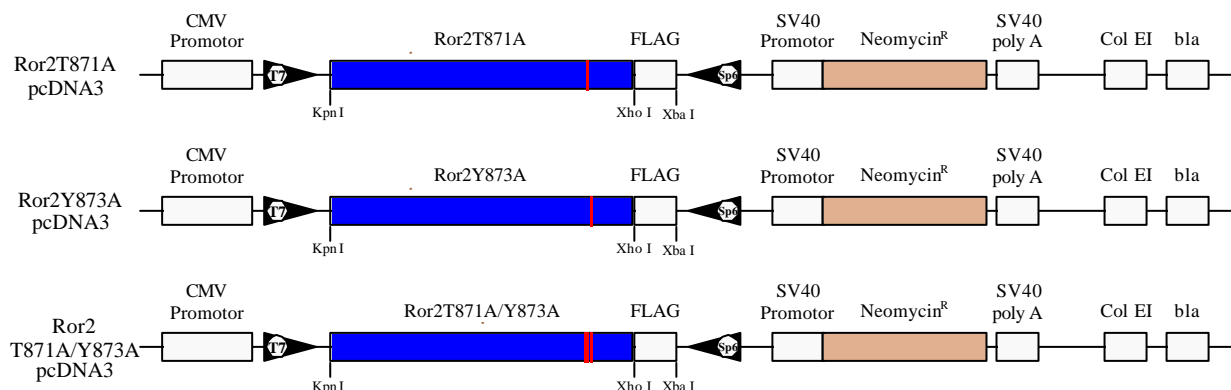


Abbildung 34: Ror2T871A, Ror2Y873A und Ror2T871A/Y873A kloniert in pcDNA3-Vektor (CMV = Cytomegalie-Virus; SV40 = Simian-Virus 40; Col EI = origin of replication; bla = β -Lactamase (verantwortlich für die Ampicillin-Resistenz))

Nach der Kontrolle der Mutagenese durch Sequenzierung des kompletten Inserts einschließlich der angrenzenden Vektorregionen unter Zuhilfenahme geeigneter Primer (T7 PCDNA FWD, ROR-N-INT4 FWD, ROR-N-INT5 FWD, ROR2 TM, ROR INT1 FWD, ROR INT2 FWD, ROR INT3 FWD; siehe Kapitel 6.1) konnten die Punktmutanten in weiteren Experimenten zum Einsatz kommen.

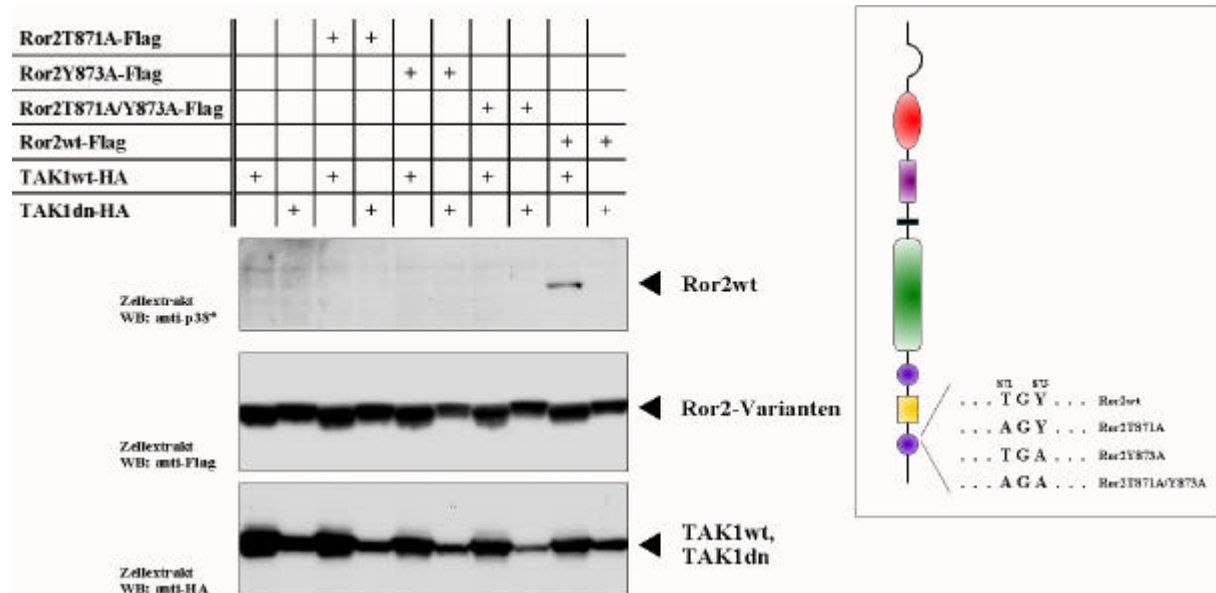


Abbildung 35: Mutationen von Ror2wt an Position 871 und/oder 873 führen zu einer Inhibierung der Phosphorylierung im TGY-Motif

Die Co-Expression von Ror2wt oder einer der Punktmutanten Ror2T871A, Ror2Y873A oder Ror2T871A/Y873A (Flag-markiert; schematische Darstellung im Kasten) mit TAK1wt oder TAK1dn (HA-markiert) in den Zellextrakten kann durch die Immunfärbung von Westernblots mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen werden (untere Bilder); im obersten Bild wird durch den p38*-Antikörper Ror2wt in der Gegenwart von TAK1wt detektiert. Eine Färbung der Punktmutanten Ror2T871A, Ror2Y873A oder Ror2T871A/Y873A in der Gegenwart von TAK1wt konnte im Gegensatz dazu nicht festgestellt werden. Wie in den vorherigen Versuchen ist in der Gegenwart von TAK1dn kein Nachweis mit p38*-Antikörper möglich.

Es zeigte sich, dass bereits die Mutanten, in denen nur eine der beiden Aminosäuren verändert wurde, nicht mehr den p38*-Antikörper binden konnten. Mit der Doppelmutter wurde ein entsprechendes Ergebnis erzielt (Abbildung 35).

Die Interaktion von TAK1wt mit Ror2 an dessen C-Terminus führt in der Tat zu einer doppelten Phosphorylierung eines TGY-Motifs in Ror2. Dabei ist die Phosphorylierung des Threonin-Restes durch die Aktivität als Serin-/Threonin-Kinase eindeutig TAK1 zuzuordnen, während die Phosphorylierung des Tyrosin-Restes für eine Auto-/Transphosphorylierung von Ror2 bedingt durch seine Überexpression spricht.

3.4.2.5 Bprp stimuliert die TAK1-abhängige Phosphorylierung von Ror2

Wie bereits in den Kapiteln 3.4.2.2 und 3.4.2.3 dargelegt, führt die Co-Expression von Bprp mit TAK1wt und Ror2wt weder zu einer Veränderung in der Interaktion von TAK1wt mit Ror2wt noch zu einer Veränderung in der Aktivierung von nachgeschalteten Kinasen.

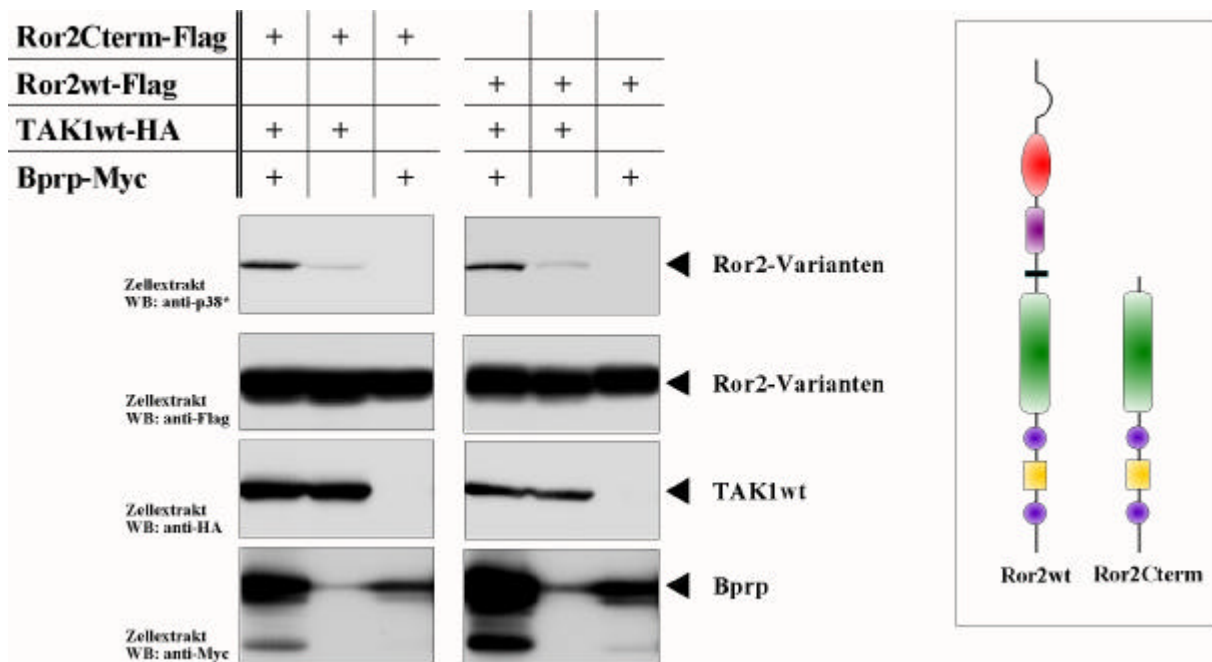


Abbildung 36: Die Co-Expression von Bprp stimuliert die Phosphorylierung des TGY-Motifs in Ror2 durch TAK1wt

Die Co-Expression von Ror2wt oder Ror2Cterm (Flag-markiert; schematische Darstellung im Kasten unten rechts) mit TAK1wt (HA-markiert) oder Bprp (Myc-markiert) in den Zellextrakten kann durch die Immunfärbung von Westernblots mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen werden (untere Bilder). In den obersten Bildern werden durch den p38*-Antikörper in Anwesenheit von TAK1wt die doppelt-phosphorylierten Ror2wt und Ror2Cterm detektiert. Dieser Nachweis wird durch zusätzliche Expression von Bprp stimuliert.

Die Co-Expression von Bprp allein führt im Gegensatz zu TAK1wt auch nicht zur Phosphorylierung des TGY-Motifs in Ror2. Zusammen mit TAK1wt hingegen kommt es zu einer deutlichen Stimulierung der Phosphorylierung gegenüber der, die für TAK1wt allein beobachtet werden kann (Abbildung 36). Im Vergleich zu den vorangegangenen Experimenten fällt die Detektion durch den p38*-Antikörper im Fall der Co-Expression mit TAK1wt scheinbar schwach aus, was durch eine geringere Expositionszeit erklärt werden kann, um die Unterschiede zwischen den Co-Expressionen mit und ohne Bprp zu verdeutlichen. Da eine Kinaseaktivität für Bprp bislang nicht beschrieben ist und von uns auch nicht gezeigt werden konnte, liegt der Schluss nahe, dass es sich bei Bprp um ein Protein handelt, welches die eigentliche enzymatische Wirkung eines anderen Proteins auf das Substrat durch ihre Interaktion mit den beiden Partnern fördert.

Es lässt sich festhalten, dass die TAK1wt-abhängige, doppelte Phosphorylierung des TGY-Motifs in Ror2 durch die zusätzliche Expression von Bprp stimuliert werden kann, ohne dass die Interaktion von Ror2 mit TAK1wt erkennbar gesteigert wird. Daraus folgt, dass die Phosphorylierung von Ror2 durch TAK1wt eine funktionell wichtige posttranslationale Modifikation darstellen könnte.

3.4.2.6 TAK1 reguliert weitere posttranslationale Modifikationen von Ror2

Ror2-Konstrukte zeigen im Westernblot prinzipiell ein mehrfaches Bandenmuster, was auf posttranslationale Modifikationen zurückgeführt werden kann. Da Ror2 in seinen extrazellulären Domänen 3 putative Stellen für die Glykosylierung an Asparagin-Resten (N-Glykosylierung) besitzt und diese Art der posttranslationalen Modifikation für Transmembranproteine häufig ist, ist die Glykosylierung eine Modifikation, die für diese Beobachtung relevant sein könnte. Die Co-Expression von TAK1 mit Ror2-Varianten zeigte, dass die Ror2-spezifische Bande in Gegenwart von TAK1wt bei einem geringeren apparenten Molekulargewicht lief als in Gegenwart von TAK1dn oder in der Abwesenheit von TAK1 (siehe Abbildung 37).

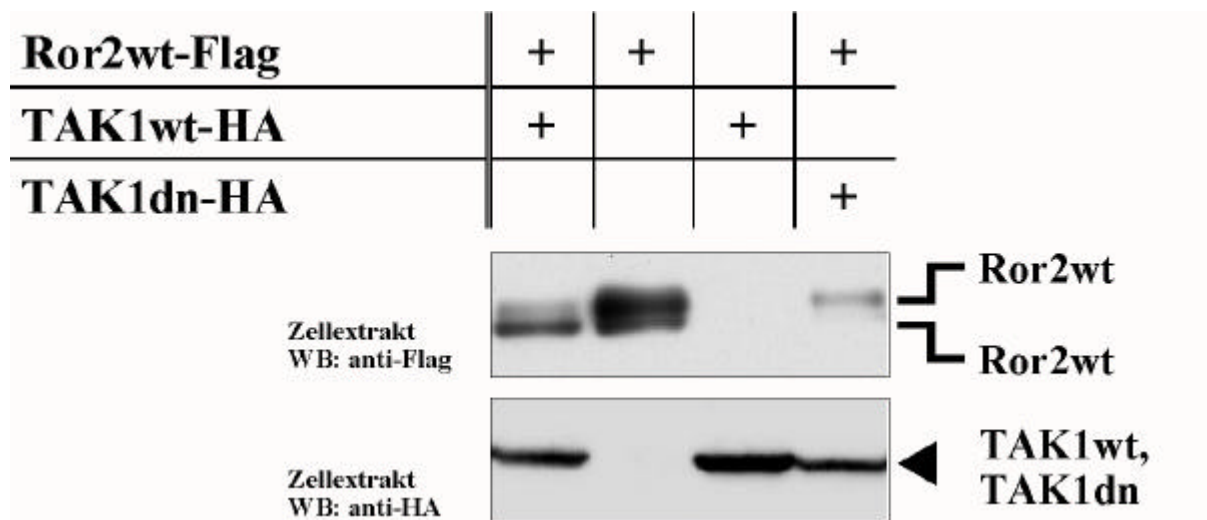


Abbildung 37: Die posttranslationale Modifikation von Ror2 wird durch aktives TAK1 verändert

Die Co-Expression von Ror2wt (Flag-markiert; schematische Darstellung im Kasten) mit TAK1wt oder TAK1dn (HA-markiert) in den Zellextrakten kann durch die Immunfärbung von Westernblots mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen werden. Dabei ist auffällig, dass in der Gegenwart von TAK1wt Ror2wt bei einem deutlich geringeren Molekulargewicht läuft als in der Anwesenheit von TAK1dn oder in der Abwesenheit von TAK1-Varianten. Diese Unterschiede konnten besonders gut nach längeren Laufzeiten in den SDS-Gelen (7,5%ig) beobachtet werden.

Im Gegensatz zur Phosphorylierung des TGY-Motifs in Ror2 ist der Einfluss auf die posttranslationale Modifikation nicht von der Interaktion von TAK1wt mit Ror2 abhängig, denn neben Ror2wt und Ror2Cterm weisen auch die Deletionsmutanten Ror2 Δ C und Ror2 Δ Tyr einen analogen Mobility-Shift in Abwesenheit von TAK1wt oder der Gegenwart von TAK1dn auf. Daraus lässt sich schließen, dass die Überexpression von TAK1wt die Aktivität der Zelle dahingehend verändert, dass eine posttranslationale Modifikation von Ror2 nicht länger stattfinden kann.

Ein direkter Einfluss von TAK1 auf die korrekte Glykosylierung von Ror2 z.B. mit Hilfe eines Lectinbindung-Tests konnte bislang nicht gezeigt werden. Die korrekte Glykosylierung von Rezeptoren ist jedoch von entscheidender Bedeutung, wenn es um die Präsentation dieser Rezeptoren auf der Zelloberfläche geht. Eine Veränderung in der Glykosylierung von Ror2 sollte sich dementsprechend auf seine Lokalisation in der Zelle auswirken.

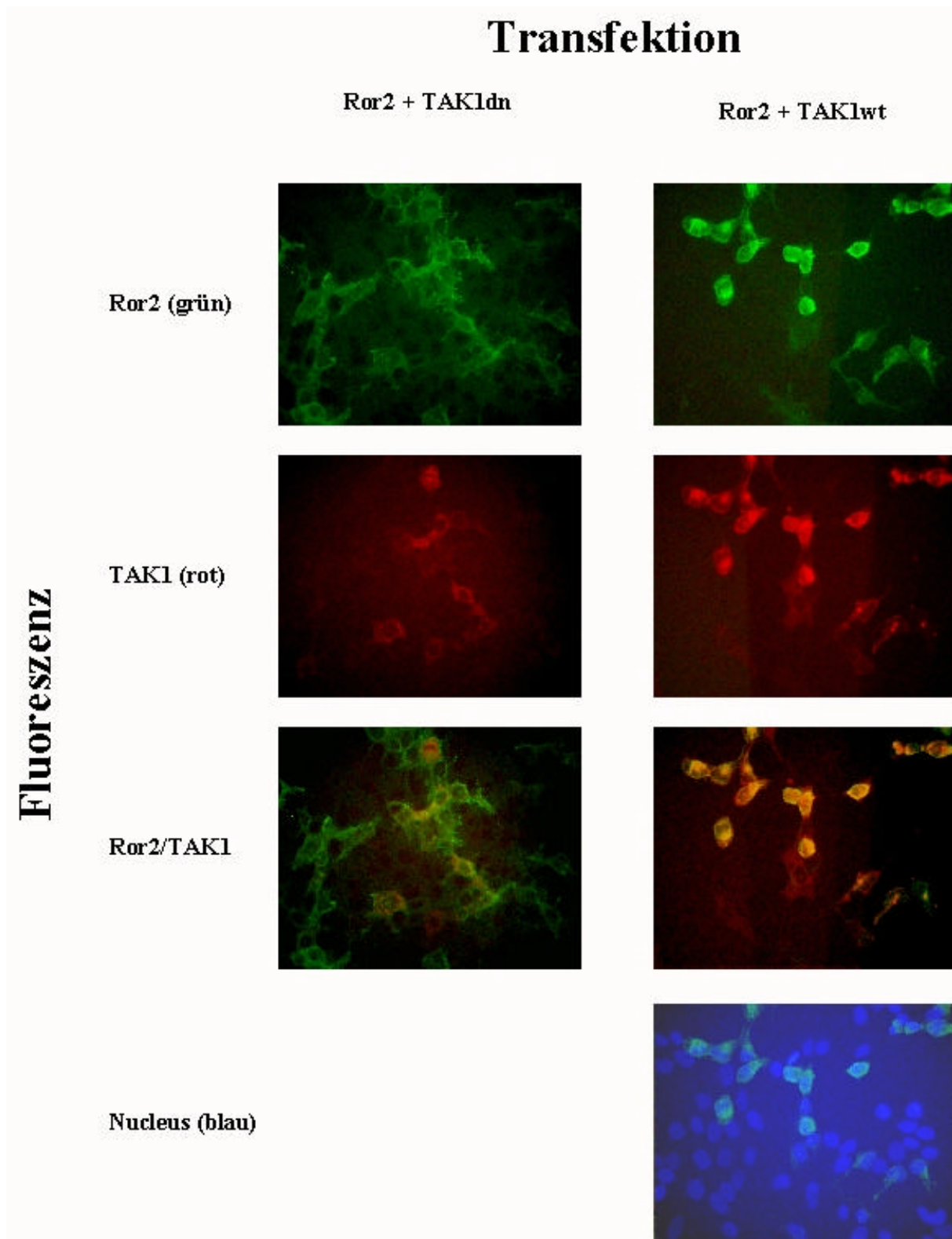


Abbildung 38: Lokalisationsänderung von Ror2 in Gegenwart von TAK1wt

Die Co-Expression von Ror2wt (Flag-markiert = grüne Fluoreszenz) mit TAK1wt oder TAK1dn (HA-markiert = rote Fluoreszenz) in den HEK-Zellen kann durch die immunhistologischen Färbungen sichtbar gemacht werden. Dabei ist auffällig, dass es im Fall der Co-Expression von Ror2wt mit TAK1wt zu einer Co-Lokalisation der beiden Fluoreszenzen in einem klar begrenzten Bereich um den Zellkern herum kommt (untere Bilder). Im Gegensatz dazu zeigt die Co-Expression von Ror2wt mit TAK1dn wie erwartet eine Lokalisation von Ror2wt (grün) an der Zelloberfläche und von TAK1dn (rot) im Cytosol.

Immunfluoreszenzfärbungen in HEK-Zellen sollten in diesem Zusammenhang den Einfluss von TAK1 auf die Lokalisation von Ror2 visualisieren (Abbildung 38). Überexprimiertes Ror2 in seiner Funktion als Rezeptor ist im wesentlichen an der Oberfläche von HEK-Zellen lokalisiert. Diese Lokalisation wird auch durch die Co-Expression von TAK1dn (cytoplasmatisch) nicht verändert (Abbildung 38 links). In der Gegenwart von TAK1wt hingegen wird die Lokalisation eindeutig in das Zellinnere verlagert (Abbildung 38 rechts). Im Detail ist eine Co-Lokalisation von Ror2wt mit TAK1wt in Bereichen, die den Zellkern umgeben, festzustellen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch aktives TAK1 die korrekte Glycosylierung und damit die Präsentation von Ror2 an der Zelloberfläche nicht länger gewährleistet ist.

3.4.3 Interaktion von Ror2 mit Faktoren der Wnt-Familie

Die Veröffentlichungen von Hikasa et al. 2002 und Oishi et al. 2003 haben erstmals die Interaktion von Faktoren der Wnt-Familie mit Ror2 in *Xenopus* bzw. in der Maus aufgezeigt. Die Wnt-Familie von sekretierten Glycoproteinen steuert eine Vielzahl von Entwicklungsprozessen, u.a. auch die Induktion bzw. die Inhibierung von Chondrogenese in mesenchymalen Stammzellen. Aufgrund ihrer Affinität zu Frizzled-Rezeptoren und das Vorhandensein einer frizzled-artigen Domäne im extrazellulären Teil von Ror2 wurde über die mögliche Interaktion von Wnts mit Ror2 schon sehr früh spekuliert, aber erst durch die oben genannten Veröffentlichungen sowohl physiologisch als auch funktionell bestätigt.

Mittels Co-Immunpräzipitation sollte auch in unserem System diese Interaktion zunächst reproduziert werden. Um nicht nur die reine Interaktion mit Ror2, sondern auch die Art dieser Interaktion zu verifizieren, sollten Vertreter sowohl des kanonischen (Wnt-1) als auch des nicht-kanonischen Wnt-Signalweges (Wnt-5a) mit verschiedenen Ror2-Konstrukten co-exprimiert werden (siehe Kapitel 1.3.3). Dazu wurden neben Ror2wt auch intrazellulär und extrazellulär veränderte Mutanten eingesetzt, um eine Interaktion von Wnts ausschließlich mit der extrazellulären Domäne von Ror2 zu verifizieren. Im Fall der intrazellulären Mutante konnte auf das bereits mehrfach angewandte Ror2 Δ Tyr zurückgegriffen werden, während im Fall der extrazellulären Mutante die Ror2-Chimäre (bestehend aus den intrazellulären Ror2-Domänen und den extrazellulären Domänen des CSF-1-Rs, siehe Kapitel 3.2) zum Einsatz kam.

3.4.3.1 Co-Immunpräzipitation von Wnts mit unterschiedlichen Varianten von Ror2

Durch Co-Expression der Flag-markierten Ror2-Varianten (Ror2wt, Ror2 Δ Tyr und Ror2-Chimäre) mit HA-markiertem Wnt-1 oder Wnt-5a in HEK-Zellen und anschließender Präzipitation mittels Flag-Antikörper können sowohl die präzipitierten Ror2-Varianten als auch die eventuell co-präzipitierten Wnts in einem Westernblot nachgewiesen werden.

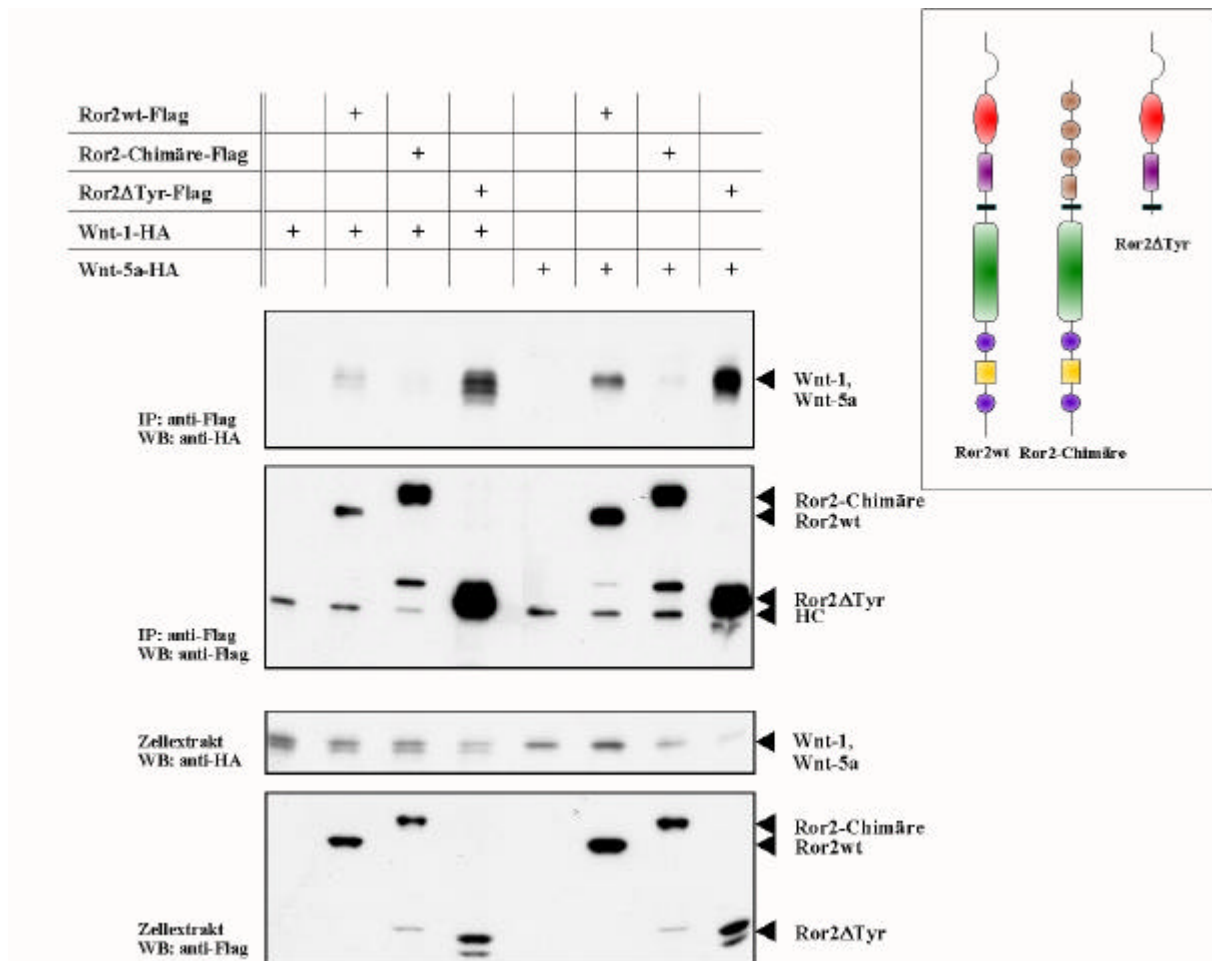


Abbildung 39: Co-Immunpräzipitation von Wnts mit unterschiedlichen Varianten von Ror2

Die Co-Expression von verschiedenen Ror2-Varianten (Flag-markiert; schematische Darstellung oben rechts) und Wnts (HA-markiert) in den Zellextrakten kann durch die Immunfärbung von Westernblots mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen werden (untere Bilder). In den oberen Bildern sind die immunpräzipitierten Ror2-Varianten und die co-präzipitierten Wnts (bei Verwendung von Ror2wt und Ror2ΔTyr) sichtbar. Es findet keine erkennbare Interaktion mit der Ror2-Chimäre statt.

Die Färbungen zeigen, dass sowohl Wnt-1 als auch Wnt-5a und somit Vertreter des kanonischen sowie des nicht-kanonischen Signalweges mit Ror2wt interagieren können. Diese Interaktion ist wie erwartet abhängig von einer intakten extrazellulären Domäne, da in den Fällen, in denen die Ror2/CSF1R-Chimäre verwendet wurde, keine Co-Präzipitation von Wnt-1 oder Wnt-5a beobachtet werden kann. Die intrazellulären Domänen von Ror2 sind hingegen nicht an einer Interaktion beteiligt, da die eingesetzten Wnts auch mit der membranständigen Ror2ΔTyr-Mutante co-präzipitiert werden konnten (Abbildung 39). Aus diesem Versuch lassen sich die Resultate aus den Veröffentlichungen bestätigen, dass Ror2 mit seiner extrazellulären Domäne spezifisch Wnts zu binden vermag und somit die Wnts als Liganden des Ror2-Rezeptors dienen.

3.4.3.2 Die kanonischen und nicht-kanonischen Wnt-Bindungen an Ror2 wirken sich unterschiedlich auf die TAK1-Interaktion aus

Bei näherer Betrachtung der Wnt-Ror2-Interaktion stellt sich die Frage, welche Konsequenzen diese in der Literatur als nicht nur physisch, sondern auch funktionell beschriebene Interaktion (Hikasa et al., 2002; Oishi et al., 2003) in unserem biologischen

System hinsichtlich einer Aktivierung des Ror2-Signalweges hat oder ob sie z.B. zur Aktivierung von intrazellulären Bindungspartnern führt.

Zu diesem Zweck wurden HEK-Zellen mit Kombinationen aus Ror2-Varianten, TAK1 und Wnt-1 bzw. Wnt-5a transfiziert. Dabei zeichnete sich ab, dass die Interaktion von Wnt-1 mit Ror2 die Interaktion von TAK1 mit Ror2 behinderte, wodurch auch die Phosphorylierung des TGY-Motifs in Gegenwart von Ror2 nicht mehr stattfinden konnte (Abbildung 40).

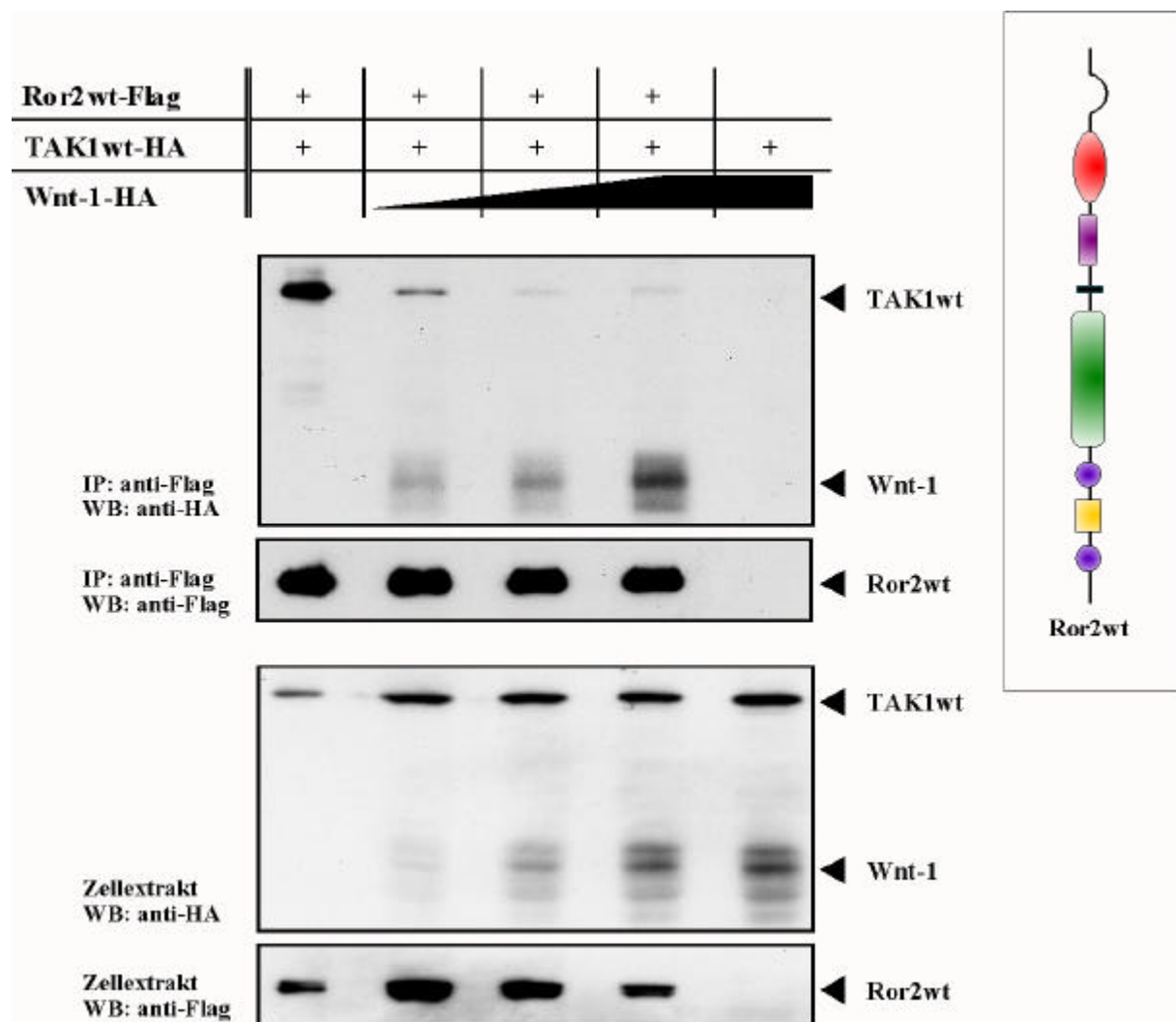


Abbildung 40: Wnt-1-Bindung an Ror2 interferiert mit der TAK1-Bindung an Ror2

Die Co-Expression von Ror2wt (Flag; schematische Darstellung oben rechts), TAK1wt (HA) und steigenden Mengen von Wnt-1 (HA) in den Zellextrakten kann durch die Immunfärbung von Westernblots mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen werden (untere Bilder); in den oberen Bildern sind das immunpräzipitierte Ror2wt und die co-präzipitierten Interaktionspartner Wnt-1 (in steigender Konzentration) und TAK1wt (in Gegenwart von Wnt-1 in sinkender Konzentration) sichtbar

Die Co-IP von Ror2 und TAK1 zeigt in der ersten Spur erneut die klare Interaktion der beiden Partner auf. Mit steigender Konzentration von Wnt-1 nimmt die Interaktion von Ror2 und TAK1 ab, was sich in der Abnahme des co-präzipitierten TAK1 äußert. Bei sehr hoher Wnt-1-Expression in der Co-IP ist die Verdrängung so stark, dass nahezu das Niveau der Hintergrundfärbung von TAK1 in der Waschkontrolle (IP ohne Ror2/ letzte Spur – unspezifische Bindung von TAK1 an die Protein G-Sepharosekügelchen) erreicht wird.

Darüber hinaus bleibt festzuhalten, dass Ror2 eine hohe Bindungsaffinität zu Wnt-1 besitzt, da sich in dieser Untersuchung auch bei sehr hoher Wnt-Expression keine Sättigung einstellen ließ (d.h. die Menge von co-präzipitiertem Wnt-1 steigt kontinuierlich an, statt konstant zu werden).

Überraschenderweise ergab eine entsprechende Co-IP in der Gegenwart von Wnt-5a anstelle von Wnt-1 durchgeführt einen ganz anderen Befund (Abbildung 41).

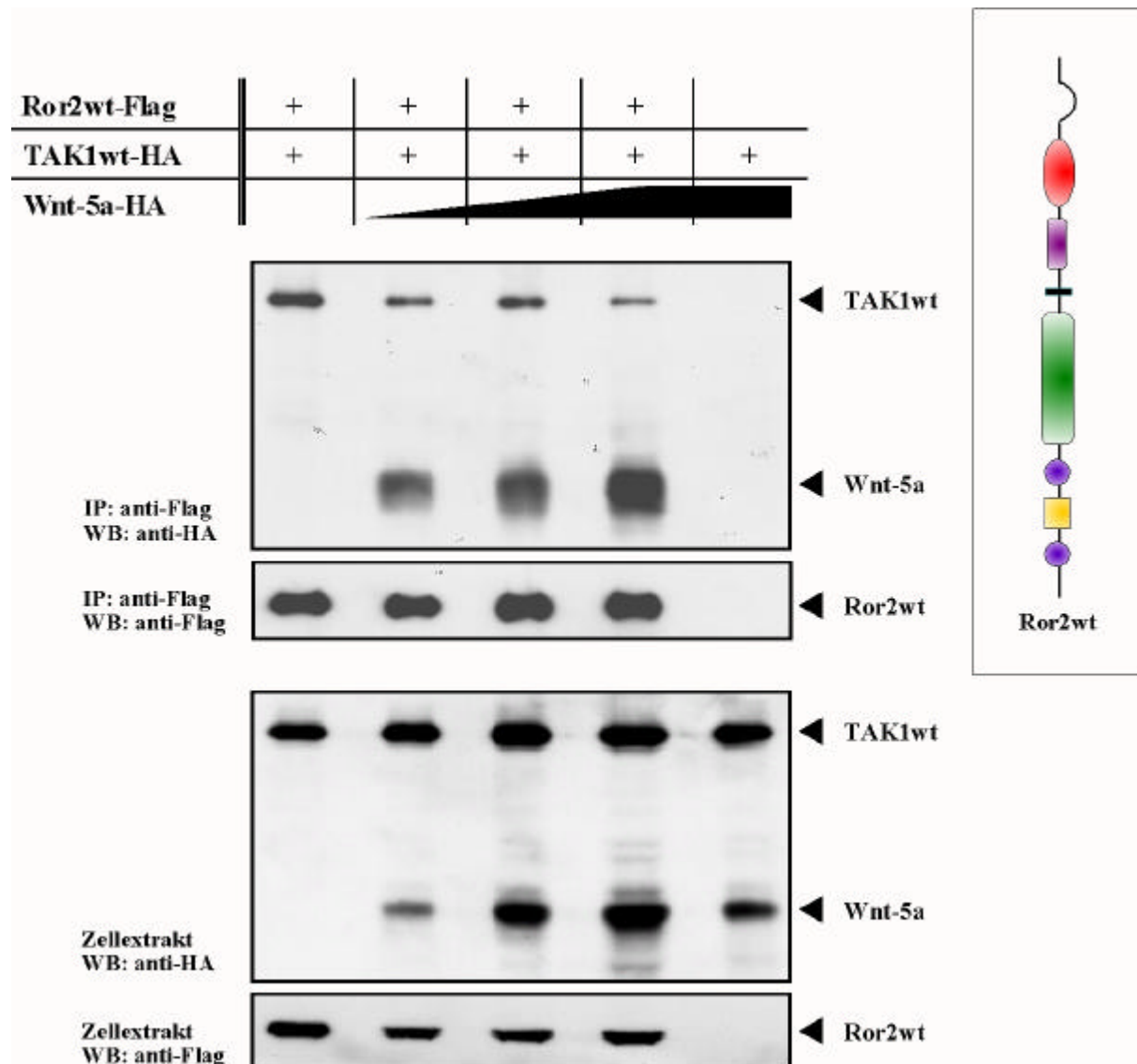


Abbildung 41: Wnt-5a-Bindung an Ror2 interferiert weniger mit der TAK1-Bindung an Ror2

Die Co-Expression von Ror2wt (Flag; schematische Darstellung oben rechts), TAK1wt (HA) und steigenden Mengen von Wnt-5a (HA) in den Zellextrakten kann durch die Immunfärbung von Westernblots mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen werden (untere Bilder); in den oberen Bildern sind das immunpräzipitierte Ror2wt und die co-präzipitierten Interaktionspartner Wnt-5a (in steigender Konzentration) und TAK1wt (in gleichbleibender Konzentration unabhängig von der Gegenwart von Wnt-5a) sichtbar.

Im Vergleich zu der vorangegangenen IP sind die Auswirkungen der Wnt-5a-Expression auf die Ausbildung des Ror-TAK1-Komplexes deutlich schwächer ausgeprägt, was man erneut an dem Vergleich zur Menge des mit Ror2 co-präzipitierten TAK1 in Abwesenheit von Wnt-5a in der ersten Spur festmachen kann. Die Konzentrationsabhängigkeit ist in diesem Fall deutlich weniger ausgeprägt - die Menge an co-präzipitiertem TAK1 liegt auch bei hoher

Wnt-5a-Konzentration immer noch deutlich über der in der Waschkontrolle. Auffällig ist aber auch hier die hohe Bindungsaffinität von Ror2 für Wnt-5a.

Da Wnt-5a als Stimulator des nicht-kanonischen Signalwegs bekannt ist und dieser den kanonischen Signalweg (Wnt-1) via TAK1 negativ reguliert (siehe Kapitel 1.3.3), stellt sich die Frage, inwieweit einer der beiden Wnt-Faktoren in der Bindung an Ror2 bevorzugt wird, bzw. ein Ligand den anderen sogar verdrängen kann. Um diese Frage zu klären, wurde Ror2 mit TAK1 in HEK-Zellen co-exprimiert. Durch die Gegenwart von mittlerer Wnt-1-Konzentration wurde ein Zustand erreicht, in dem die Verdrängung von TAK1 aus dem Ror2-TAK1-Komplex bereits partiell vollzogen ist. Zu dieser Konstellation wurden zusätzlich steigende Konzentrationen an Wnt-5a zu der Co-IP hinzugefügt.

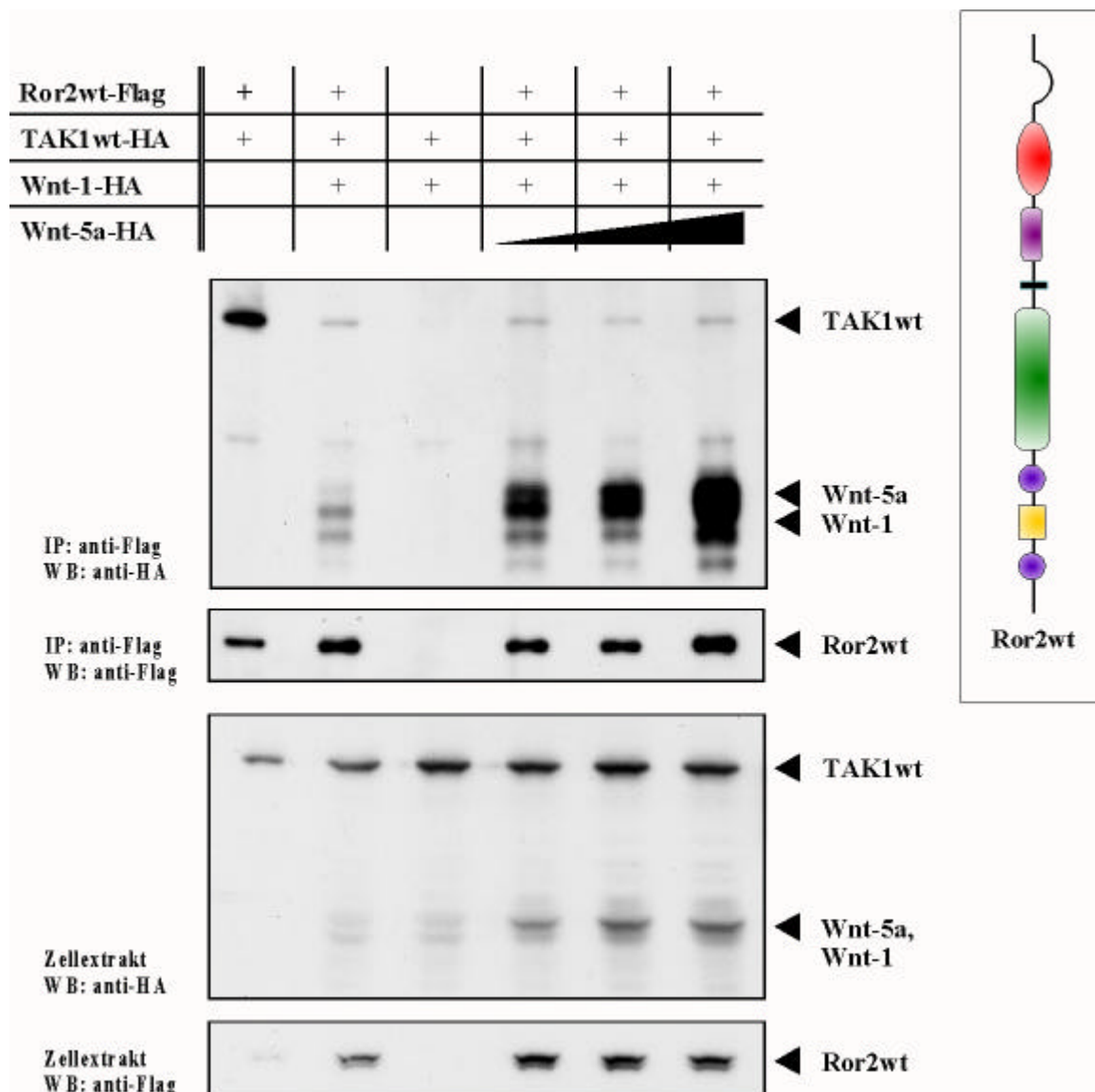


Abbildung 42: Wnt-5a kann die Verdrängung von TAK1 aus der Ror2-TAK1-Interaktion durch Wnt-1 nicht verhindern

Die Co-Expression von Ror2wt (Flag; schematische Darstellung oben rechts), TAK1wt (HA), Wnt-1 (HA) und steigenden Mengen von Wnt-5a (HA) in den Zellextrakten kann durch die Immunfärbung von Westernblots mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen werden (untere Bilder); dabei kann zwischen Wnt-1- und Wnt-5a-Expression (siehe Pfeile) nicht unterschieden werden, da beide eine ähnliche Größe und das gleiche „Tag“ besitzen. In den oberen Bildern sind das immunpräzipitierte Ror2wt und die co-präzipitierten Interaktionspartner Wnt-5a (in steigender Konzentration), Wnt-1 und TAK1wt (in Gegenwart von Wnt-1 in sinkender Konzentration) sichtbar.

Wie bereits aufgezeigt, bedingt die Gegenwart von Wnt-1 die Verdrängung von TAK1 aus dem Ror2-TAK1-Komplex bis hin zum Status in der Waschkontrolle (Abbildung 42; erste bis dritte Spur). Die zusätzliche Anwesenheit von steigenden Konzentrationen Wnt-5a führt nicht dazu, dass die Verdrängung in geringerem Umfang stattfindet, obwohl offensichtlich die Bindung von Wnt-5a an den Ror2-TAK1-Komplex (angezeigt durch die steigende Menge an co-präzipitiertem Wnt-5a) nicht wesentlich durch die Bindung von Wnt-1 an diesen Komplex gestört wird. Umgekehrt wird die Bindung von Wnt-1 an den Ror2-TAK1-Komplex (angezeigt durch die Verdrängung von TAK1) nicht durch die Bindung von Wnt-5a an diesen Komplex beeinflusst.

Die aus der Co-IP gewonnenen Erkenntnisse über die Interaktionen von Ror2-Varianten mit Vertretern der Wnt-Familie einerseits und TAK1 andererseits machen es sinnvoll, die Wnt-Signalwege zu untersuchen.

Zur Analyse sowohl des kanonischen als auch des nicht-kanonischen Wnt-Signalweges wurden Reporter-gen-Assays mit den sogenannten Top-Flash-Plasmiden durchgeführt.

3.5 Top-Flash-Experimente

Bei der Expression von Genen spielen Transkriptionsfaktoren und die dazugehörigen DNA-Bindestellen in den genspezifischen Promotoren eine entscheidende Rolle. Die Transkriptionsfaktoren stehen dabei unter der Kontrolle ganz unterschiedlicher Signalwege. Um den Einfluss von einzelnen Proteinen auf Signalwege, auf die Transkriptionsfaktoren und somit auf die Expression bestimmter Gene zu visualisieren, wird in einem Plasmid ein geeignetes Reporter-gen, z.B. Luciferase, dessen enzymatische Aktivität quantitativ leicht zu bestimmen ist, unter die Kontrolle der dazugehörigen Promotorsequenzen gestellt. Auf diese Weise spiegelt die Stärke der gemessenen Luciferaseaktivität direkt die Höhe der Expression des eigentlichen Zielgens unter den gleichen Bedingungen wieder.

Aufgrund meiner Ergebnisse in den Co-Immunpräzipitationen und den Erkenntnissen in der Literatur über die Interaktion von Ror2 und Wnts sind Untersuchungen der Wnt-Signalwege und der Einfluss von Ror2, Ror2-Varianten und mit Ror2 interagierenden Faktoren auf diese Signalwege hier von besonderem Interesse. Sowohl der kanonische als auch der nicht-kanonische Wnt-Signalweg zielen auf die Regulation der Aktivität des Transkriptionsfaktors TCF (siehe Kapitel 1.3.3). Zur Untersuchung dieser beiden Wnt-Signalwege mit Hilfe eines Reporter-gen-Assays wird vielfach das sogenannte Top-Flash-System angewandt.

Zusätzlich wird zur Kontrolle der Effizienz der Transfektion und der Lyse der Zellen ein Kontrollplasmid mit konstitutiv exprimierender β -Galaktosidase unter dem Einfluss des starken RSV-Promotors transfiziert. Der Quotient aus Luciferase- und β -Galaktosidase-Aktivität stellt somit ein Maß für die Interaktion von TCF mit seiner Bindestelle dar.

Zunächst einmal sollte der Einfluss der Überexpression einzelner Proteine auf die endogenen Wnt-Signalwege dokumentiert werden. Hierzu wurden HEK293-Zellen transient mit Wnt-1, Wnt-5a, Ror2wt, Ror2 Δ C, Ror2 Δ Tyr, TAK1wt oder Bprp in Kombination mit dem RSV-lacZ-Plasmid und dem Top-Flash-Plasmid transfiziert.

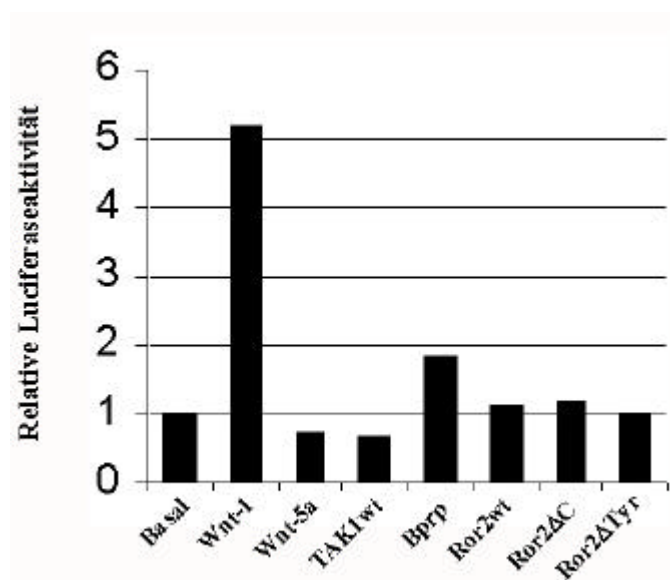


Abbildung 43: Auswirkungen der Überexpression von Wnt-1, Wnt-5a, TAK1wt, Bprp oder Ror2-Varianten auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors TCF

Dargestellt werden die Veränderungen in der Aktivität von TCF durch die Änderungen in der gemessenen Luciferase-Aktivität (normalisiert gegenüber einer basalen Luciferaseaktivität = 1) in Abhängigkeit zur Überexpression diverser Faktoren (Wnt-1, Wnt-5a, Ror2wt, Ror2 Δ C, Ror2 Δ Tyr, TAK1wt oder Bprp).

Die abgebildeten Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten aus drei Versuchen.

Wie in Abbildung 43 gezeigt, führt die Überexpression von Wnt-1, einem Vertreter der kanonischen Wnt-Familie, erwartungsgemäß zu einer deutlichen Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges, was sich in einer mehr als 5fachen Steigerung der basalen Luciferase-Aktivität niederschlägt (eine Steigerung in dieser Größenordnung liegt laut der Literatur im Bereich dessen, was für Vertreter der Wnt-1-Familie erwartet werden kann). Andererseits hat die Expression von Wnt-5a oder TAK1wt, beides Vertreter des nicht-kanonischen Wnt-Signalweges, eine leichte Inhibierung des kanonischen Wnt-Signalweges und somit eine Verringerung der Luciferaseaktivität zur Folge. Die relativ geringfügigen Auswirkungen auf die basale Luciferaseaktivität lassen sich dadurch erklären, dass in dem hier vorliegenden Fall der durch Wnt-5a oder TAK1wt aktivierte nicht-kanonische Signalweg sich nur inhibierend auf den basal in den Zellen vorkommenden kanonischen Signalweg auswirken kann. Die Auswirkungen der Überexpression von Ror2-Varianten oder Bprp auf die Wnt-Signalwege sind im Gegensatz dazu bislang nicht in der Literatur beschrieben. Nur eine leichte Steigerung der Luciferaseaktivität kann in Gegenwart der Ror2-Varianten wahrgenommen werden. Deutlich stärker fällt diese für die Bprp-Expression aus, was die Fähigkeit von Bprp demonstriert, aktivierend auf den endogenen kanonischen Wnt-Signalweg einzuwirken.

Aufgrund der in den Co-IPs dokumentierten Interaktion von Ror2 mit Wnt-1 und der aufgestellten Hypothese, dass Ror2 nur Liganden-abhängig in der Lage ist, auf Signalwege Einfluss zu nehmen, ist es von Interesse die Auswirkungen der Überexpression von Ror2-Varianten in einem Wnt-1-stimulierten Hintergrund zu beobachten.

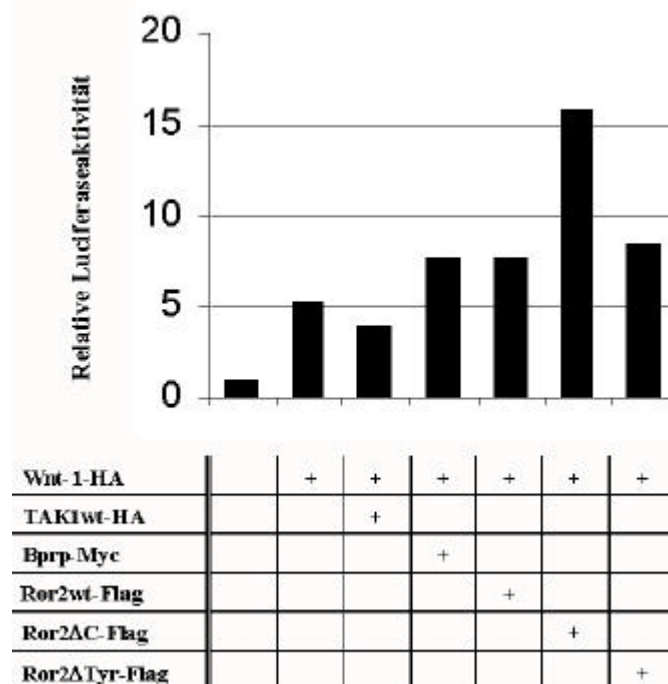


Abbildung 44: Auswirkungen der Überexpression von TAK1wt, Bprp oder Ror2-Varianten auf die Wnt-1-abhängige Aktivität des Transkriptionsfaktors TCF

Dargestellt werden die Veränderungen in der Wnt-1-abhängigen Aktivität von TCF durch die Änderungen in der gemessenen Luciferase-Aktivität (normalisiert gegenüber einer basalen Luciferaseaktivität = 1) in Abhängigkeit zur Überexpression diverser Faktoren (Ror2wt, Ror2ΔC, Ror2ΔTyr, TAK1wt oder Bprp).

Die abgebildeten Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten aus drei Versuchen.

Im Wnt-1-Hintergrund konnte bereits eine 5fache Steigerung der basalen Luciferaseaktivität beobachtet werden. Durch zusätzliche Expression von TAK1wt, also einem Vertreter des nicht-kanonischen Signalweges, wird diese von Wnt-1 verursachte Luciferaseaktivität erwartungsgemäß deutlich inhibiert. Bprp hingegen hat erneut eine deutlich stimulierende Wirkung. Die zusätzliche Expression von Ror2-Varianten führt generell zu einem stimulierenden Effekt der Wnt-1-bedingten Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges. Extrem erhöht jedoch ist sie nur bei der Ror2 Δ C-Mutante (Abbildung 44). Sie unterscheidet sich durch das Fehlen der C-terminalen Serin-/Threonin- und Prolin-reichen Sequenzen von Ror2wt und eine intakte Tyrosin-Kinase-Domäne von der Ror2 Δ Tyr-Mutante.

Da die extrazelluläre Interaktion von Ror2wt mit Wnt-1 zur intrazellulären Inhibierung der TAK1wt-Interaktion führt, stellt sich die Frage, inwieweit die kombinierte Expression von Wnt-1, Bprp, TAK1wt und den unterschiedlichen Ror2-Varianten zu Veränderungen in der Luciferaseaktivität führt.

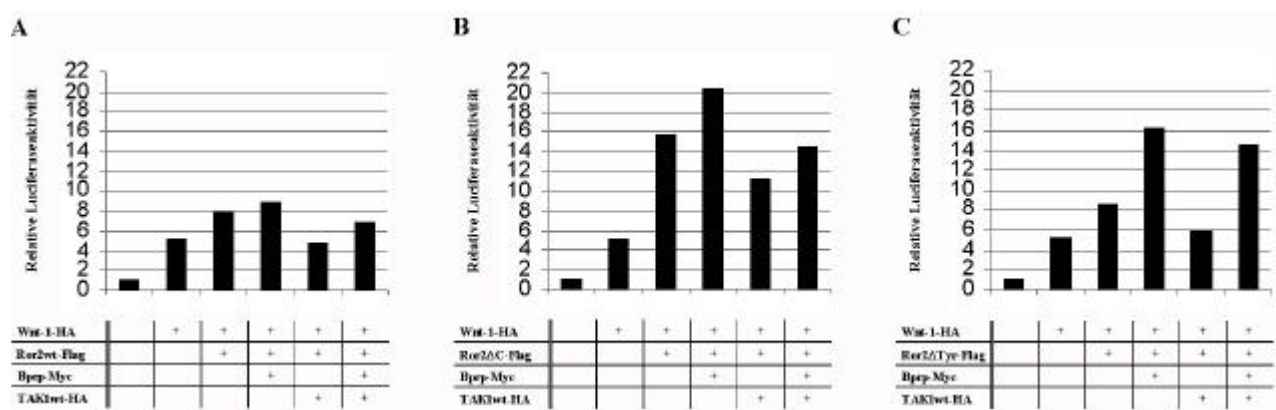


Abbildung 45: Auswirkungen der Überexpression von TAK1wt und/oder Bprp zusammen mit den Ror2-Varianten auf die Wnt-1-abhängige Aktivität des Transkriptionsfaktors TCF

Dargestellt werden die Veränderungen in der Wnt-1-abhängigen Aktivität von TCF durch die Änderungen in der gemessenen Luciferase-Aktivität (normalisiert gegenüber einer basalen Luciferaseaktivität = 1) in Abhängigkeit zur Überexpression von Ror2-Varianten (Ror2wt, Ror2 Δ C oder Ror2 Δ Tyr) und zusätzlich diverser Faktoren-Kombinationen (TAK1wt und/oder Bprp). Die unterschiedlichen Diagramme unterscheiden sich in der zur Anwendung gekommenen Ror2-Variante (Ror2wt in Abbildung A, Ror2 Δ C in Abbildung B oder Ror2 Δ Tyr in Abbildung C).

Die abgebildeten Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten aus drei Versuchen.

Der deutliche stimulierende Effekt der Ror2wt-Expression auf die Wnt-1-abhängige Luciferaseaktivität kann durch die zusätzliche Expression von Bprp noch einmal erkennbar verstärkt werden. Die zusätzliche Expression von TAK1wt hingegen hat einen inhibierenden Effekt. Eine kombinierte Expression von beiden führt nahezu zu einem Ausgleich der negativen und positiven Einflüsse von TAK1wt und Bprp auf den kanonischen Wnt-Signalweg (Abbildung 45 A).

Vergleichbares ist in der Tendenz auch für die anderen Ror2-Varianten erkennbar, auch wenn sich die Ausprägungen der einzelnen Ereignisse durchaus voneinander unterscheiden (Abbildung 45 B und C). So sind z.B. die stimulierenden Auswirkungen von Bprp vor dem Hintergrund einer Ror2 Δ Tyr-Überexpression deutlich stärker ausgeprägt als bei den beiden anderen Ror2-Varianten. Allgemein lässt sich allerdings festhalten, dass die Effekte offenbar unabhängig von der Art der Mutation von Ror2 oder den daraus resultierenden unterschiedlichen Interaktionsmöglichkeiten mit intrazellulären Interaktionspartnern (TAK1wt, Bprp) sind.

Dies deutet darauf hin, dass die extrazelluläre Interaktion der Ror2-Varianten mit Teilen des kanonischen Wnt-Signalweges (hier: Wnt-1) bereits zu einer deutlichen Stimulierung der Luciferaseaktivität beiträgt (Abbildung 45 C). Dieser Effekt wird durch eine intakte Tyrosinkinasedomäne noch erheblich verstärkt (Abbildung 45 B), im gleichen Umfang aber durch die C-terminalen Serin-/Threonin- und Prolin-reichen Domänen wieder abgeschwächt (Abbildung 45 A).

Der generell stimulierende Effekt von Bprp und der generell inhibierende Effekt von TAK1wt scheint dabei unbeeinflusst von einer zusätzlichen Expression der Ror2-Varianten zu sein. Diese Beobachtung verwundert nicht weiter, wenn man sich vergegenwärtigt, dass entweder kein Einfluss auf TAK1wt und/oder Bprp ausgeübt werden kann, da sie nicht mit dem gewählten Ror2-Konstrukt zur Interaktion befähigt sind (Ror2 Δ C, Ror2 Δ Tyr) oder aber die Interaktion mit Wnt-1 eine Interaktion mit den intrazellulären Interaktionspartnern inhibiert (Ror2wt in der Co-IP, siehe Abbildung 40).

Im Gegensatz zu Wnt-1 ist mit Wnt-5a, also einem Vertreter des nicht-kanonischen Signalweges, die Interaktion von Ror2wt mit TAK1 nicht so stark gestört. Einflüsse von Wnt-5a über Ror2wt auf die intrazellulären Interaktionspartner müssten folglich durchaus nachweisbar sein. Für eine Beteiligung von Ror2 an den nicht-kanonischen Wnt-Signalwegen sprechen auch die Ergebnisse von Hikasa et al., 2002 und Oishi et al., 2003, die in ihren Veröffentlichungen die synergistischen Effekte der Ror2-Expression mit Vertretern der nicht-kanonischen Wnt-Familie (Wnt-5a) auf die konvergente Ausdehnung von Xenopus-Embryonen beschreiben.

Um die Einflüsse der Ror2-Varianten auf den nicht-kanonischen Wnt-Signalweg besser untersuchen zu können, musste zunächst ein Weg gefunden werden, den kanonischen Signalweg über die basale Aktivität hinaus zu aktivieren, ohne dafür auf die Überexpression von Wnt-1 zurückgreifen zu müssen. Die Gegenwart von Wnt-1 in der Co-IP hat schließlich auch bei gleichzeitiger Expression von Wnt-5a die Verdrängung von TAK1wt aus dem Ror2-TAK1-Komplex bewirkt, was eine Verfälschung der Ergebnisse für den nicht-kanonischen Signalweg zur Folge hätte. Am einfachsten kann dieses Ziel durch die Zugabe von LiCl erreicht werden. Die dadurch anfallenden freien Cl-Ionen binden Mg^{2+} -Ionen, welche folglich nicht mehr für die Enzymaktivität der GSK-3 β zur Verfügung stehen, bewirken die Anreicherung von β -Catenin im Cytoplasma und im Nucleus und somit indirekt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors TCF (siehe Kapitel 1.3.3).

Für die folgenden Versuche wurden somit die HEK-Zellen nach erfolgter Transfektion (ca. 7-9 h vor der Ernte der Zellen) mit 20 mM LiCl durch einfache Zugabe zum Medium behandelt. Alle weiteren Schritte unterscheiden sich nicht zu denen der vorangegangenen Versuche. Diese Behandlung führte zu einer ungefähr 7fachen Erhöhung der basalen Luciferaseaktivität (Abbildung 46 A + B).

Erneut sollte zunächst einmal der Einfluss der Überexpression einzelner Proteine auf die Wnt-Signalwege dokumentiert werden.

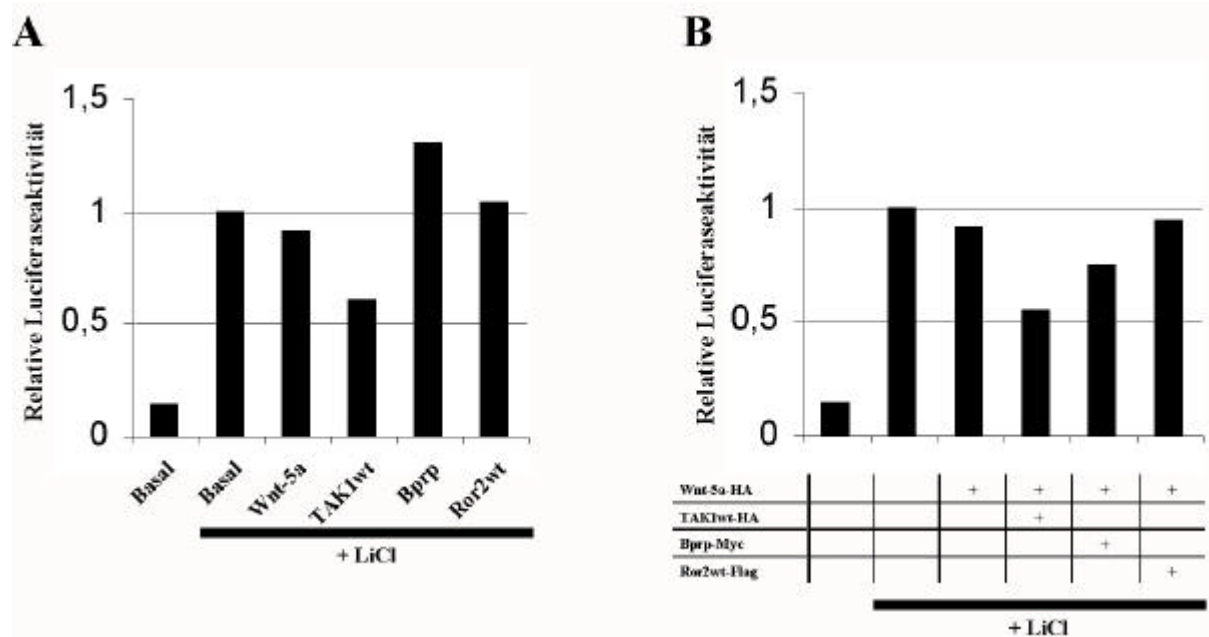


Abbildung 46: Auswirkungen der Überexpression von Wnt-5a, TAK1wt, Bprp oder Ror2wt auf die LiCl-abhängige Aktivität des Transkriptionsfaktors TCF

A: Dargestellt werden die Veränderungen in der Aktivität von TCF durch die Änderungen in der gemessenen Luciferase-Aktivität in Abhängigkeit zur LiCl-Stimulierung (normalisiert gegenüber einer basalen Luciferaseaktivität = 1) und der zusätzlichen Überexpression diverser Faktoren (Wnt-5a, TAK1wt, Bprp oder Ror2wt).

B: Dargestellt werden die Veränderungen in der Wnt-5a- und LiCl-abhängigen Aktivität von TCF durch die Änderungen in der gemessenen Luciferase-Aktivität (normalisiert gegenüber einer basalen Luciferaseaktivität = 1) in Abhängigkeit zur Überexpression diverser Faktoren (TAK1wt, Bprp oder Ror2wt).

Die abgebildeten Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten aus drei Versuchen.

Wie in Abbildung 46 A gezeigt, führt die Überexpression sowohl von Wnt-5a als auch von TAK1wt alleine zu einer Inhibierung des kanonischen Wnt-Signalweges, was sich in einer Verminderung der LiCl-stimulierten Luciferase-Aktivität niederschlägt. Diese Inhibierung fällt im Fall von Wnt-5a überraschend gering und im Fall von TAK1wt wie erwartet sehr deutlich aus. Im Gegensatz dazu wirkt sich die Expression von Bprp deutlich stimulierend auf die Luciferaseaktivität aus, während für die Ror2wt-Überexpression kein eindeutiger Effekt dokumentiert werden konnte. Diese Ergebnisse decken sich im Wesentlichen mit denen aus den Versuchen ohne LiCl-Behandlung (siehe Abbildung 43).

Im Wnt-5a-Hintergrund zeigt sich, dass die Inhibierung von Wnt-5a durch die zusätzliche Expression von TAK1wt deutlich verstärkt werden kann. Umgekehrt wird die TAK1wt-abhängige Inhibierung durch Wnt-5a kaum verstärkt. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass in unserem System TAK1wt allein durch seine Autophosphorylierung bereits einen sehr deutlichen Effekt auf den nicht-kanonischen Wnt-Signalweg ausübt und dieser Effekt durch die schwach ausgeprägte Stimulation von Wnt-5a nur leicht verstärkt werden kann (Abbildung 46 A + B). Diese Beobachtung kann trotzdem als eine Bestätigung für die funktionelle Interaktion dieser beiden Faktoren im Rahmen des nicht-kanonischen Signalweges angesehen werden. Die Co-Expression von Ror2wt führt im Gegensatz dazu nicht zu einer Verstärkung des von Wnt-5a-induzierten nicht-kanonischen Wnt-Signalweges. Da aus der leichten Stimulation des kanonischen Wnt-Signalweges durch Ror2wt allein eine leichte Inhibierung in Gegenwart von Wnt-5a geworden ist (Abbildung 46 A + B), stellt sich die Frage, ob dieser geringe Effekt nur auf die geringe Aktivität von Wnt-5a zurückzuführen

ist. Es ist ebenfalls denkbar, dass Ror2 entgegen den Ergebnissen in der Literatur in unserem System nicht in der Lage ist, den nicht-kanonischen Signalweg Wnt-5a-abhängig zu aktivieren, sondern vielmehr eine gegensätzliche Auswirkung besitzt.

Überraschend sind in diesem Experiment die Ergebnisse für die Co-Expression von Bprp mit Wnt-5a. Aus der Stimulation des kanonischen Wnt-Signalweges durch Bprp allein (Abbildung 46 A) wird in Gegenwart von Wnt-5a eine Stimulation des nicht-kanonischen Wnt-Signalweges über den Effekt von Wnt-5a allein hinaus (Abbildung 46 B). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Bprp nicht nur in der Lage ist, den kanonischen, sondern unter Umständen auch den nicht-kanonischen Wnt-Signalweg zu stimulieren.

Die Co-Expression von weiteren Faktoren oder der im kanonischen Signalweg zum Einsatz gekommenen Ror2-Varianten hat keine eindeutigen Ergebnisse geliefert, weshalb diese Ergebnisse auch nicht in diesem Rahmen dargestellt werden können. Wir gehen davon aus, dass die LiCl-Behandlung nicht nur Auswirkungen auf die Aktivität von GSK-3 β hat, sondern eventuell auch andere Kinasen inhibiert (Mg²⁺-Abhängigkeit), weswegen auch die bisherigen Ergebnisse in dem LiCl-stimulierten System kritisch zu bewerten sind.

In zukünftigen Experimenten wollen wir deshalb auf Zelllinien mit konstitutiv aktiven kanonischen Signalwegen (z.B. Tumorzellen) oder die Überexpression von konstitutiv aktiven Vertretern des kanonischen Signalweges zurückgreifen, um dieses Problem zu umgehen und die Auswirkungen von Ror2-Varianten auf den nicht-kanonischen Wnt-Signalweg besser analysieren zu können.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten:

- Die Überexpression von Ror2-Varianten allein führt nicht zu einer Aktivierung des kanonischen oder des nicht-kanonischen Wnt-Signalweges.
- Im Wnt-1-stimulierten Hintergrund hingegen konnte mit allen Ror2-Varianten eine deutliche synergistische Stimulierung des kanonischen Wnt-Signalweges beobachtet werden, wobei die Deletionsmutanten Ror2 Δ C und Ror2 Δ Tyr im Vergleich zu Ror2wt den stärkeren Effekt aufweisen konnten.
- Bprp hat einen stimulierenden Einfluss auf den kanonischen Wnt-Signalweg (sowohl allein als auch im Wnt-1- oder LiCl-stimulierten Hintergrund). Im Zusammenspiel mit Wnt-5a hingegen scheint sich die Aktivität auf den nicht-kanonischen Wnt-Signalweg umzulagern.
- TAK1wt hat wie erwartet unter allen Bedingungen einen inhibitorischen Einfluss auf den kanonischen Wnt-Signalweg.

3.6 Adenovirus-Experimente

Die rekombinante Expression von Ror2wt oder einer putativ dominant negativen Variante von Ror2 (Ror2 Δ C) in C3H10T $\frac{1}{2}$ - oder C3H10T $\frac{1}{2}$ BMP2-Zellen hat nicht zu starken Veränderungen in der Osteo-/Chondrogenese dieser Zellen geführt. Die im Verlauf dieser Doktorarbeit gewonnenen Erkenntnisse über direkte und indirekte Interaktionspartner (Bprp, FGFR2, FGFR3, ActR II, TGF- β -R II, TAK1wt, Wnt-1 oder Wnt-5a) und im besonderen die Auswirkungen der Ror2-Varianten auf die Wnt-Signalwege lassen weitere Untersuchungen in zellularen Systemen sinnvoll erscheinen. Die Aufmerksamkeit soll hierbei auf die osteo-/chondrogene Entwicklung von mesenchymalen und eventuell auch embryonalen Stammzellen gelenkt werden, da Ror2 in seiner Funktion offenbar schon früh in der Entwicklung ansetzt.

Für eine geplante Analyse des Einflusses von Wnt-Signalwegen auf das osteo-/chondrogene Differenzierungsverhalten von mesenchymalen Vorläuferzellen und die Funktion, die Ror2-Varianten und ihre putativen intrazellulären Interaktionspartner (TAK1wt und Bprp) in diesem Zusammenhang haben, bietet sich folglich eine Verwendung von Adenoviren an.

Bei der adenoviralen Infektion handelt es sich um eine transiente Transfektion. Darüber hinaus unterscheidet sich die Verwendung von Adenoviren für die Transfektion von Zellen in einigen Punkten entscheidend von der bereits zum Einsatz gekommenen stabilen Transfektion. Am Anfang erscheint die Produktion, Analyse und Aufreinigung von rekombinanten Adenoviren wesentlich aufwendiger als die Klonierung eines Zielgenes in ein Selektionsplasmid, anschließend birgt sein Einsatz aber einige Vorteile, die für unsere zukünftigen Fragestellungen zum tragen kommen:

- Die stabile Transfektion einer Zelllinie mit einem Zielgen zieht eine anschließende Selektionierung der transfizierten Zellen und eine aufwendige Analyse der erhaltenen Klone u.a. im Hinblick auf die Höhe der Expression des Zielgenes nach sich, bevor die eigentlichen Versuche durchgeführt werden können. Im Gegensatz dazu kann die Infektion mit Adenoviren direkt in den Versuchen erfolgen, der Zeitpunkt der Expression des Zielgens wird dabei durch den Zeitpunkt der Infektion, die Expressionshöhe durch die Infektionsrate der Zellen bestimmt.
- Bei Verlagerung des Interesses auf andere Zelllinien muss im Fall der stabilen Transfektion immer wieder von vorne angefangen werden. Adenoviren hingegen können sehr schnell auch bei anderen Zelllinien zum Einsatz kommen und sind darüber hinaus in der Lage ein sehr breites Spektrum an Zellen aus unterschiedlichen Lebewesen zu infizieren.
- Die kombinierte Expression von mehreren unterschiedlichen Zielgenen in einer Zelllinie stellt bei der stabilen Transfektion eine sehr große Herausforderung dar, da die einzelnen Plasmide sich in ihren Selektionsmarkern unterscheiden müssen und bei der anschließenden Analyse Klone gefunden werden müssen, die die einzelnen Zielgene in gewünschter Höhe exprimieren. In einem Experiment mit Adenoviren kann einfach ein Gemisch aus verschiedenen Adenoviren zur Infektion der Zielzellen verwendet werden.

Adenoviren gehören zu der Familie der DNA-Viren und besitzen ein lineares doppelsträngiges Genom. Die in der Genregulation- und Genexpressionsforschung am häufigsten eingesetzten Adenoviren sind humane Adenoviren vom Serotyp 5 (Ad5) und Serotyp 2 (Ad2). Die zum Einsatz kommende Adeno-X-virale DNA des Adeno-XTM Expression Systems von der Firma Clontech ist eine Ad 5 E1/E3-Deletionsmutante, die die Zielzellen zwar infizieren, sich darin aber nicht replizieren kann, sofern die verwendete Zelllinie diese Deletionen nicht ausgleicht (HEK293LP).

3.6.1 Klonierung von BMP2 und Ror2wt in pShuttle

Die Zielgene BMP2 (als Positivkontrolle der osteo-/chondrogenen Differenzierung) und Ror2wt wurden mit Restriktionsendonukleasen (BMP2: EcoRI und BamHI/ Ror2wt: HindIII und XbaI) aus ihren Vektoren geschnitten und aufgereinigt. Da pShuttle keine geeigneten Restriktionssites für eine direkte Klonierung aufwies, mussten die isolierten Inserts durch Klenow-Polymerasebehandlung mit sogenannten “blunt-ends” (“glatten Enden”) versehen werden.

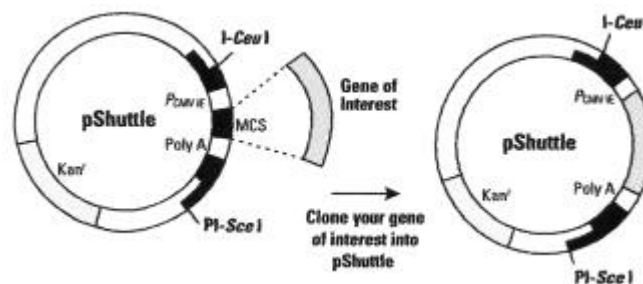


Abbildung 47: Klonierung des Zielgens in pShuttle

Das Zielgen wurde in die ebenfalls “gebluntete” und mit Alkalischer Phosphatase dephosphorylierte MCS (multiple cloning site) des pShuttle-Vektors ligiert, in DH5 α -Bakterien (Selektion mit Kanamycin) vermehrt und anschließend einem Doppelverdau mit PI-SceI/ I-Ceu unterzogen. Parallel dazu wurde auch der lacZ-pShuttle-Vektor auf die gleiche Weise gespalten (lacZ-Adenoviren sollen später der Kontrolle dienen).

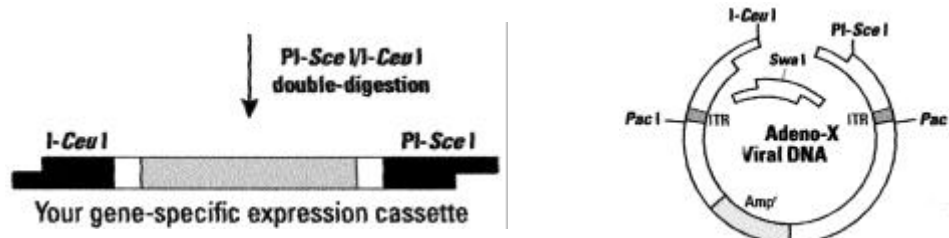


Abbildung 48: Verdauung mit PI-SceI/ I-Ceu und Darstellung des Adeno-X-Viral-DNA-Vektors.

Diese Expressionskassetten wurden *in vitro* mit dem Adeno-X-Viral-DNA-Vektor ligiert und mit SwaI verdaut. Dieser Verdau mit SwaI ist notwendig, da die virale DNA zwar restringiert vorliegt, aber nicht aufgereinigt worden ist. Er dient somit der Linearisierung von re-ligierten Adeno-X-Viral-DNA-Vektoren und trägt dazu bei, dass nur Vektoren, die mit der Expressionskassette ligiert sind, in DH5 α vervielfältigt werden können (Selektion mit Ampicillin).

Die so erhaltenen rekombinanten Adeno-XTM Viral-Vektoren werden mit PacI verdaut, um die linearisierte Virus-DNA freizusetzen (begrenzt von ITRs (inverted terminal repeats)).

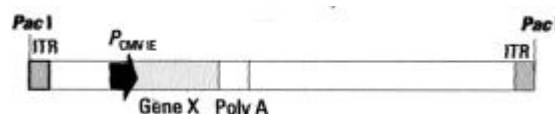


Abbildung 49: PacI-Verdau zur Linearisierung der rekombinanten DNA

Eine frühe Passage der HEK293 Low Passage (LP)-Zellen wurde mit den DNA-Konstrukten nach der CaCl_2 -Methode transfiziert (siehe Kapitel 2.6.1.4). Die rekombinanten Adenoviren wurden geerntet, in mehreren Schritten in größeren Mengen produziert (siehe Kapitel 2.6.3) und schließlich auf DNA- und Protein-Ebene charakterisiert.

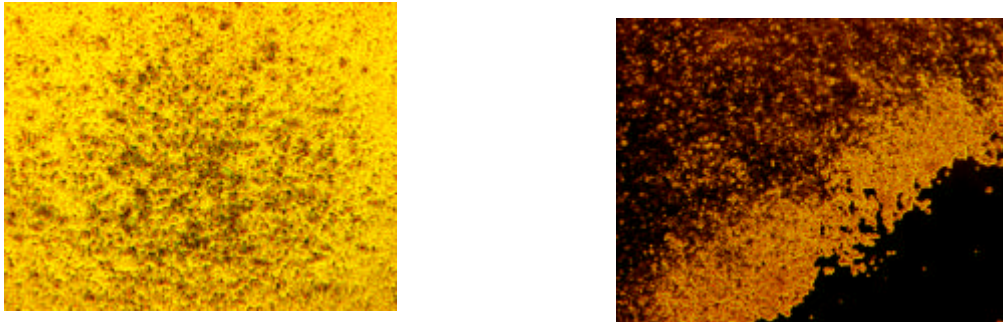


Abbildung 50: Darstellung der typischen Morphologie eines Plaques im Anfangsstadium (links) sowie eines fortgeschrittenen Plaques (rechts)

Die dunklen Zellen in der linken Abbildung sind bereits mit dem Virus infiziert. Sie werden bald lysieren und damit neue Zellen infizieren. Die Zellen in der rechten Abbildung sind zum Teil schon komplett lysiert (schwarze Fläche). Die an diese 'leere' Fläche angrenzenden, hell aufleuchtenden Zellen weisen eine runde Morphologie auf und stehen kurz vor der Lyse.

3.6.2 Analyse der Prä-Infektionen von AV-lacZ, AV-BMP2 und AV-Ror2 auf DNA- und Protein-Ebene

Die DNA-Isolierung (siehe Kapitel 2.6.2.3) brachte für alle Konstrukte verwertbare DNA-Mengen hervor. Durch Sequenzierung dieser DNAs (siehe Kapitel 2.2) konnten die produzierten Adenoviren bestätigt werden.

In den isolierten Proteinextrakten (siehe Kapitel 2.6.2.4) sollte die Expression der jeweiligen rekombinanten Gene, die mittels Adenovirus in A549-Zellen eingebracht worden sind, nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck wurden die Proteine in einer SDS-Page ihrer Größe nach aufgetrennt und in einem Westernblot mit Hilfe von spezifischen Antikörpern detektiert.

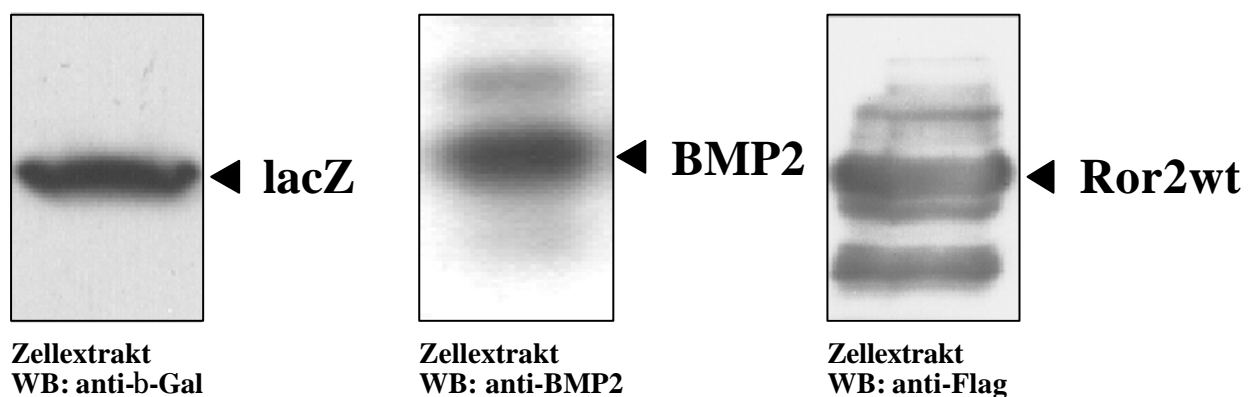


Abbildung 51: Proteinanalyse von AV-lacZ, AV-BMP2 und AV-Ror2wt nach 24 h.

Die Antikörperfärbungen von allen drei Konstrukten (Flag-AK für Ror2wt, β -Gal-AK für lacZ und BMP2-AK für BMP2) zeigten auch für die kurzen Expressionszeiten (24h) eine sehr hohe Proteinkonzentration in den untersuchten Proben.

3.6.3 Aufreinigung und Titrierung von AV-lacZ, AV-BMP2 und AV-Ror2wt

Für die anstehenden Differenzierungskinetiken ist es unerlässlich, mit aufgereinigten und klar definierbaren Mengen von Adenoviren zu arbeiten, um jegliche Beeinflussung der Experimente durch Faktoren in den Zellysaten oder unterschiedliche Mengen des verwendeten Virus von vorn herein ausschließen zu können. Zu diesem Zweck wurden die Adenoviren über CsCl-Gradientenzentrifugation aufgereinigt, aufkonzentriert und anschließend titriert (siehe Kapitel 2.6.3.3 und 2.6.4).

Die HEK293LP-Zellen wurden zwei Wochen lang auf entstehende Plaques untersucht und die Ergebnisse einer Verdünnung an verschiedenen Tagen verglichen und ausgewertet. Aussagekräftige Resultate konnten vor allem für die Verdünnungen im Bereich von 10^{-9} bis 10^{-11} an den Tagen 6-14 beobachtet werden, da bei diesen drei Verdünnungen die Bildung der Plaques über den genannten Zeitraum konstant blieb.

Anhand des Mittelwertes dieser Zahlen konnten die Konzentrationen der Viren unter Einbeziehung des Verdünnungsfaktors und der eingesetzten Virusmenge (200 μ l) bestimmt werden, die in plaque forming units/ml (pfu/ml) angegeben werden:

Virus	Viruskonzentration	Anzahl an Plaques/ Verdünnung		
		10^{-9}	10^{-10}	10^{-11}
AV-lacZ	$2,5 \times 10^{11}$ pfu/ml	Na	5,5	0,5
AV-BMP2	$1,0 \times 10^{12}$ pfu/ml	Na	>20	2
AV-Ror2wt	$1,25 \times 10^{11}$ pfu/ml	21,5	2,5	-

Tabelle 2: Auswertung der Titrierung

Angegeben sind die gemittelten Plaques der unterschiedlichen aufgereinigten Viren (AV-lacZ, AV-BMP2 und AV-Ror2wt) bei verschiedenen Verdünnungen (rechts); daraus ergeben sich die Viruskonzentrationen der einzelnen Proben (links)

3.6.4 Einfluss der adenoviralen Überexpression von lacZ, BMP2 oder Ror2wt auf das Differenzierungsverhalten von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

Für die Differenzierungsstudien von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen mit AV-lacZ, AV-BMP2 und AV-Ror2wt sollte mit einer MOI 100 (multiplicity of infection) gearbeitet werden. Diese Angabe sagt aus, dass jede C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zelle mit dem 100fachen an Viren infiziert wird. Die einzusetzende Volumenmenge der Viren errechnet sich demzufolge aus der Anzahl der C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen bei Konfluenz in einer kleinen Flasche ($1,25 \times 10^6$ Zellen), multipliziert mit dem Wert 100, dividiert durch die ermittelte Konzentration. Nach der Infektion der Zellen am Tag 0 wurde die Differenzierung der Zellen über einen begrenzten Zeitraum hinweg angeregt und mittels RT-PCR von Markergenen und histologischer Färbungen das Differenzierungsverhalten der C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen dokumentiert.

Die in diesem Zusammenhang angewandten Methoden sind im Kapitel 2.4 beschrieben.

3.6.5 Histologische Färbungen

Die fixierten Zellen wurden mit Alkalischer Phosphatase (osteoblasten-typischer Marker) und Alcian-Blau (chondrozyten-typischer Marker) entsprechend der Kinetik in Kapitel 3.1.2 angefärbt.

Chondrozyten

In den folgenden Abbildungen ist die Differenzierung der C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen nach Infektion mit AV-lacZ, AV-BMP2 oder AV-Ror2wt zu Chondrozyten dargestellt.

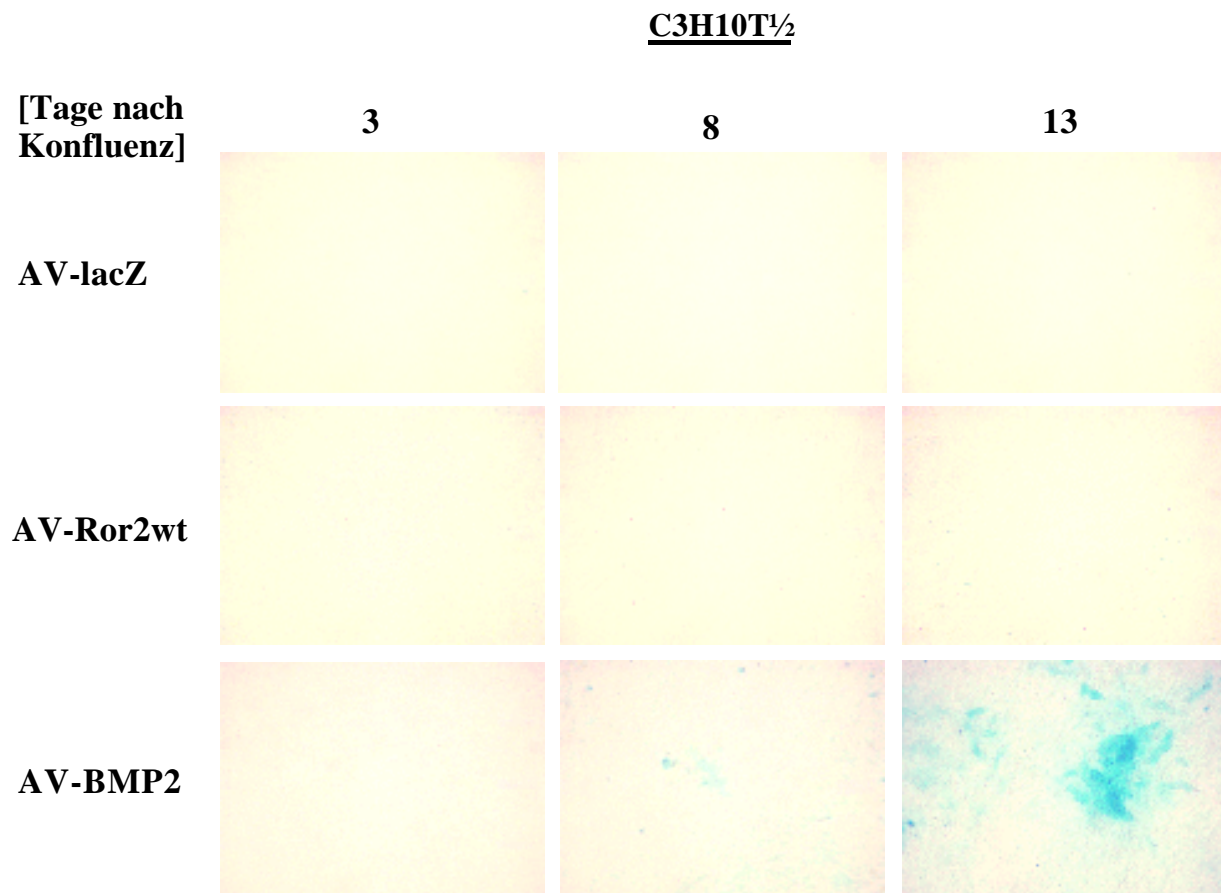


Abbildung 52: Chondrozytenfärbung von mit AV-lacZ, AV-Ror2wt oder AV-BMP2 infizierten C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen; Vergrößerung 1:40

Die Bildung von Chondrozyten wird durch das Anfärben von Proteoglykanen in der Zellmatrix durch den Farbstoff Alcian-Blau sichtbar gemacht. Dargestellt sind die Auswirkungen von verschiedenen Infektionen auf die Chondrogenese von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen (oben: AV-lacZ, Mitte: AV-Ror2wt, unten AV-BMP2) zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung.

Es ist deutlich zu erkennen, dass nur die mit AV-BMP2 infizierten C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen zu den mittleren und späten Zeitpunkten der Kinetik eine deutlich chondrogene Entwicklung aufweisen (Abbildung 52; Tag 8 und 13), während die Infektion mit AV-lacZ oder AV-Ror2wt keine erkennbare Stimulation der Chondrogenese bewirkt.

Osteoblasten

Die folgenden Abbildungen zeigen die Alkalische Phosphatase-Aktivität von mit AV-lacZ, AV-BMP2 oder AV-Ror2wt infizierten C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen.

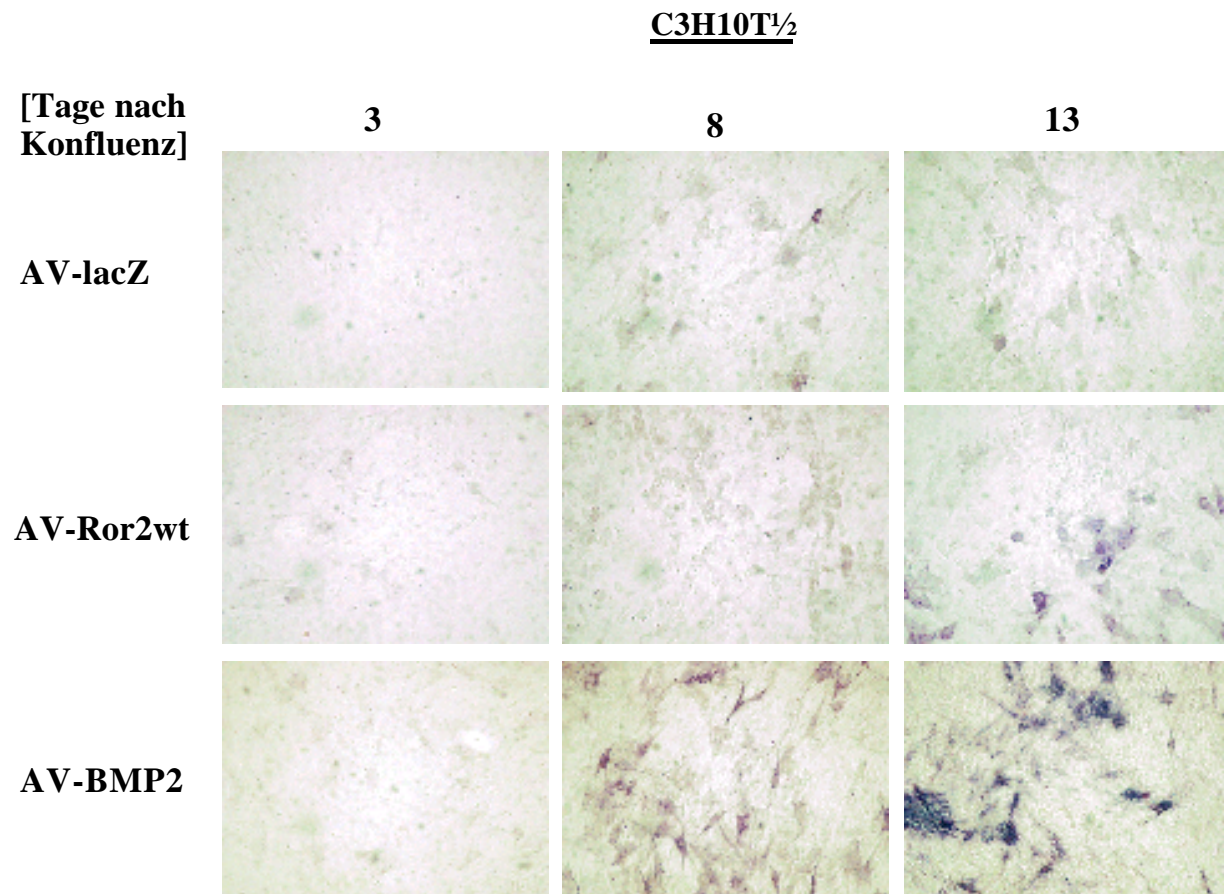


Abbildung 53: Osteoblastenfärbung von mit AV-lacZ, AV-Ror2wt oder AV-BMP2 infizierten C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen; Vergrößerung 1:40

Die Bildung von Osteoblasten wird durch die enzymatische Aktivität der Alkalischen Phosphatase und der dadurch bedingten intensiv dunkel violetten Färbung der Zellen bei Zugabe von BCIP/NBT sichtbar gemacht. Dargestellt sind die Auswirkungen von verschiedenen Infektionen auf die Osteogenese von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen (oben: AV-lacZ, Mitte: AV-Ror2wt, unten AV-BMP2) zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung.

Vergleichbar zur Alcian-Blau Färbung von chondrogener Matrix fällt auch die Alkalische Phosphatase Färbung der infizierten C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen aus. Starke Färbungen konnten nur nach Infektion mit AV-BMP2 beobachtet werden (Abbildung 53; Tag 8 und 13).

3.6.6 Untersuchung der Genexpression osteo-/chondrogener Markergene in infizierten C3H10T^{1/2}-Zellen während der Differenzierung

Neben der Analyse von Markergenen zur Prüfung der Ergebnisse aus den histologischen Färbungen lassen sich auch noch andere Fragen anhand von PCRs klären. Zum einen soll in diesem Rahmen die Effizienz der Infektion von C3H10T^{1/2}-Zellen dokumentiert werden. Darüber hinaus lässt sich die endogene Expression von Ror2-interagierenden Faktoren, die in dieser Dissertation beschrieben werden konnten, in C3H10T^{1/2}-Zellen dokumentieren.

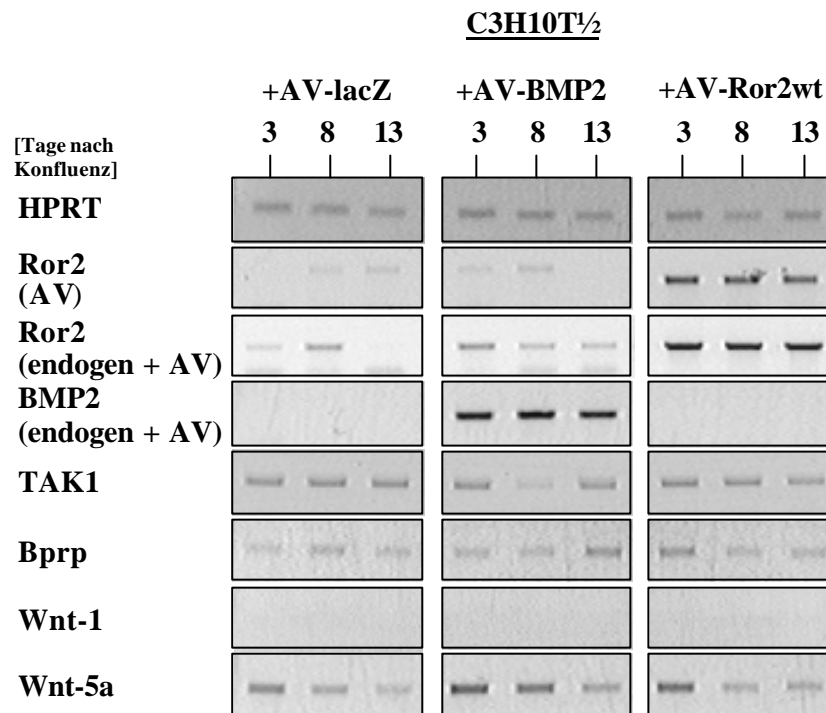


Abbildung 54: Rekombinante und endogene Expression in C3H10T^{1/2}-Zellen

Dargestellt ist die Expression von diversen Genen im Vergleich zum Haushaltsgen HPRT anhand von PCRs mit spezifischen Primern (HPRT = 1 µl 1:10, Annealing Temp. 52°C, 25 Zyklen; Ror2 (AV) = 1 µl 1:10, Annealing Temp. 52°C, 35 Zyklen; Ror2 (endogen + AV) = 1 µl 1:10, Annealing Temp. 59°C, 30 Zyklen; BMP2 (endogen + AV) = 1 µl 1:10, Annealing Temp. 60,1°C, 30 Zyklen; TAK1 = 1 µl 1:10, Annealing Temp. 59°C, 32 Zyklen; Bprp = 1 µl 1:10, Annealing Temp. 55°C, 45 Zyklen; Wnt-1 = 1 µl 1:10, Annealing Temp. 56,5°C, 35 Zyklen; Wnt-5a = 1 µl 1:10, Annealing Temp. 57°C, 35 Zyklen)

Zunächst wurde zum Abgleich der Proben erneut eine PCR zur Amplifikation des Haushaltsgens HPRT durchgeführt (Abbildung 54, HPRT). Anschließend wurde anhand von spezifischen Primern einerseits die Expression von rekombinant exprimiertem Ror2 allein dokumentiert (Abbildung 54, Ror2 (AV)) und andererseits die dadurch erzielte Steigerung der Ror2-Expression im Vergleich zur endogenen Expression (Abbildung 54, Ror2 (endogen + AV)) dargestellt. Es bleibt festzuhalten, dass in C3H10T^{1/2}-Zellen bereits eine endogene Ror2-Expression dokumentiert werden kann, die durch die Infektion mit AV-Ror2wt deutlich gesteigert werden kann. Die rekombinante Expression von Ror2wt und die daraus resultierende Steigerung der gesamten Ror2-Expression in den C3H10T^{1/2}-Zellen ist dabei deutlich höher einzuschätzen als die in den stabilen Transfektionen aus der ersten Kinetik (siehe Kapitel 3.1.2). Eine ähnlich hohe rekombinante Expression konnte auch für BMP2 nach Infektion mit AV-BMP2 erzielt werden, während die Infektion mit AV-Ror2wt keine Steigerung der BMP2-Expression bewirkte.

Für die zukünftigen Experimente ist es natürlich von Bedeutung, ob die im Rahmen dieser Dissertation ermittelten Interaktionspartner von Ror2 in den von uns zu untersuchenden Zelllinien auch exprimiert werden und somit die daraus resultierenden Signalwege (z.B. Wnt-Signalwege) in diesen Zelllinien auch eine Rolle spielen und von uns manipuliert werden können.

Betrachten wir in diesem Zusammenhang die endogene Expression der intrazellulären Interaktionspartner TAK1 oder Bprp, lässt sich beobachten, dass beide in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen konstant exprimiert werden. Dabei sind die Expressionen unabhängig von den zusätzlichen Infektionen mit AV-BMP2 oder AV-Ror2wt und dem Zeitpunkt der Differenzierung (Abbildung 54).

Die Expression von Wnt-5a ist im Gegensatz dazu über die Differenzierung hinweg nicht konstant, sondern verringert sich im Verlauf der Kinetik. Außerdem sind leichte Steigerungen in der Expression nach Infektion mit AV-BMP2 oder AV-Ror2wt im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten (Abbildung 54). Eine endogene Expression von Wnt-1 konnte zu keinem Zeitpunkt in einer der hier untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden (Abbildung 54).

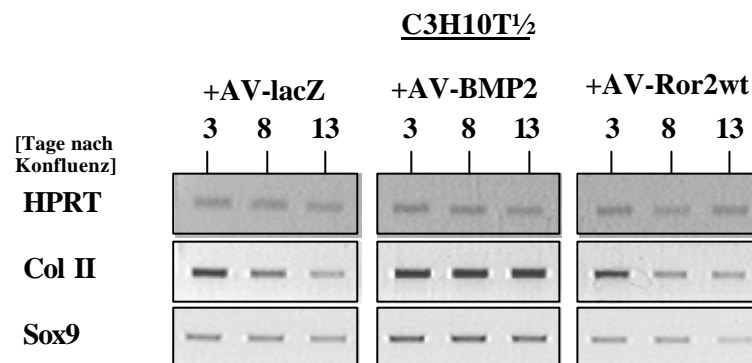
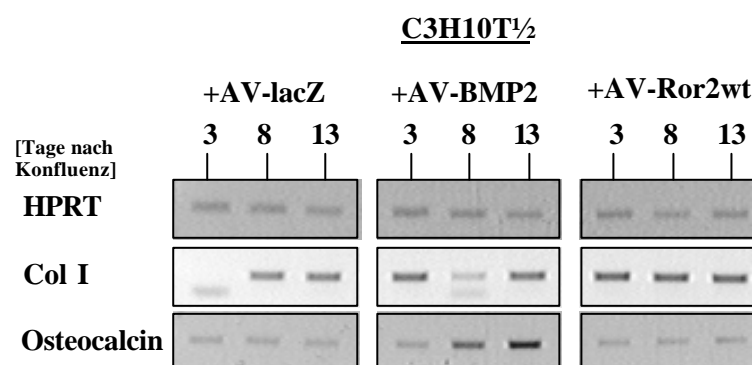
A**B**

Abbildung 55: Einfluss der rekombinanten Expression von lacZ, BMP2 oder Ror2wt auf die Expression chondrogener (A) und osteogener (B) Markergene in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

A: Dargestellt ist die Expression von chondrogenen Markergenen im Vergleich zum Haushaltsgen HPRT anhand von PCRs mit spezifischen Primern (HPRT = 1 μ l 1:10, Annealing Temp. 52°C, 25 Zyklen; Col II = 1 μ l 1:10, Annealing Temp. 54,6°C, 30 Zyklen; Sox9 = 1 μ l 1:10, Annealing Temp. 64,1°C, 32 Zyklen)

B: Dargestellt ist die Expression von osteogenen Markergenen im Vergleich zum Haushaltsgen HPRT anhand von PCRs mit spezifischen Primern (HPRT = 1 μ l 1:10, Annealing Temp. 52°C, 25 Zyklen; Col I = 1 μ l 1:10, Annealing Temp. 51,8°C, 30 Zyklen; Osteocalcin = 1 μ l 1:10, Annealing Temp. 56,6°C, 30 Zyklen)

Bei der Analyse der osteo-/chondrogenen Markergene konnten die Ergebnisse der ersten Kinetik (siehe Kapitel 3.1.2.2) und der histologischen Färbungen bestätigt werden. Demnach führt auch im adenoviralen System die Überexpression von BMP2 zu einer osteo-/chondrogenen Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen im Gegensatz zur Kontrollzelllinie (AV-lacZ). Dies äußert sich in einer verstärkten Expression der chondrogenen Markergene Kollagen Typ II und Sox9 (Abbildung 55 A) sowie in einer im Verlauf der Differenzierung stark ansteigenden Expression des osteogenen Markergens Osteocalcin, während die Expression von Kollagen Typ I unbeeinflusst bleibt (Abbildung 55 B). Die rekombinante Expression von Ror2wt weist hingegen keine erkennbaren Veränderungen in der Expression der aufgeführten Markergene im Vergleich zur Kontrolle (AV-lacZ) auf.

Entsprechend den Ergebnissen der 1. Kinetik (siehe Kapitel 3.1.2) zeigen demzufolge auch die Überexpressionen von Ror2wt in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen vermittelt durch Adenovirus-Infektion, dass die Überexpression von Ror2wt allein keine Auswirkung auf die Differenzierung in die osteo- oder chondrogene Richtung hat. Die Produktion der Adenoviren AV-Ror2wt, AV-BMP2 und AV-lacZ stellt allerdings den ersten Schritt für eine bessere Analyse des Einflusses von Ror2wt auf die Differenzierung nicht nur von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen, sondern auch anderer Zelllinien im Zusammenhang mit z.B. Wnt-Signalwegen dar. Zu diesem Zweck werden momentan weitere Faktoren, die in dieser Dissertation als Ror2-interagierend beschrieben werden konnten, in Adenovirus-Expressionsvektoren umklontiert.

4 Diskussion

Ror2 (Regeneron orphan receptor 2) ist ein Vertreter der relativ kleinen Ror-Familie innerhalb der RTKs (Rezeptor Tyrosinkinasen) und spielt eine entscheidende Rolle in der Morphogenese und den Entwicklungsprozessen von verschiedenen Tierarten. Der Verlust von Ror2-Expression in der Maus führt zu Kleinwuchs, Verkürzungen von Gliedern und Schwanz, Gesichtsanomalien, Herzfehlern und Atemfehlfunktionen (DeChiara et al., 2000; Takeuchi et al., 2000), wobei sich letztere nach der Geburt lethal auswirken. Die Haploinsuffizienz hingegen weist keinen erkennbaren Phänotyp auf. Im Menschen sind Mutationen in Ror2 verantwortlich für verschiedene genetische Erkrankungen. Punktmutationen im extrazellulären Bereich, die sich vermutlich auf die Interaktion von Ror2 mit Liganden auswirken, führen ebenso zur Ausprägung des rezessiven Robinow-Syndroms wie Mutationen, die einen Funktionsverlust der Tyrosinkinase-Domäne nach sich ziehen (siehe Kapitel 1.2.3). Im Gegensatz dazu führen Deletionen des gesamten intrazellulären Bereichs oder der C-terminalen Serin-/Threonin- und Prolin-reichen Sequenzen zur Ausprägung der dominanten Brachydaktylie Typ B (Afzal et al., 2000; Oldridge et al., 2000; van Bokhoven et al., 2000).

Trotz dieses Wissens über die Funktion von Ror2 und die Auswirkungen von Mutationen auf die Embryonalentwicklung in vielen Organismen konnten bislang nur wenige Erkenntnisse darüber gewonnen werden, in welchen Signalwegen Ror2 eine Rolle spielt und welche Interaktionen dabei zum Tragen kommen. Diese Doktorarbeit trägt dazu bei, Ror2 durch physische und funktionelle Interaktionen mit diversen Signalwegen in Verbindung zu bringen. Dabei wurde auf unterschiedliche experimentelle Ansätze zurückgegriffen, um Verbindungen insbesondere an der Osteo-/Chondrogenese beteiligter Signalwege mit Ror2 darzustellen.

4.1 Auswirkungen der Überexpression von Ror2 auf endogene Signalwege

In diesem ersten Abschnitt möchte ich auf die Ergebnisse eingehen, die durch die Überexpression von Ror2-Varianten in unterschiedlichen zellulären Systemen beobachtet werden konnten. Sie basieren auf der allgemeinen Erkenntnis, dass die Überexpression von Tyrosin-Kinasen und Tyrosin-Kinase-Rezeptoren über Auto-/Transphosphorylierung zu deren Aktivierung führen kann. In dem hier vorliegenden Fall könnte eine Überexpression von Ror2 demzufolge über endogene Interaktionspartner zur Aktivierung von Ror2-abhängigen Signalwegen führen, welche mittels unterschiedlicher Verfahren dargestellt werden kann.

4.1.1 Überexpression von Ror2 allein induziert nicht die osteo-/chondrogene Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

Im zellulären System sollte aufgrund des im Menschen beobachteten Phänotyps eine Beeinflussung der osteo-/chondrogenen Differenzierung dieser Zellen dokumentiert werden. Zu diesem Zweck erscheint die murine pluripotente Vorläuferzelllinie C3H10T $\frac{1}{2}$ besonders geeignet, da sie ein relativ frühes Stadium der mesenchymalen Zelldeterminierung repräsentiert (Reznikoff, 1973). Ursprünglich einen undifferenzierten, fibroblastoiden Charakter aufweisend, verfügt diese Zelllinie über das Potential, unter geeigneten Kulturbedingungen in distinkte mesenchymale Zellpopulationen wie Adipocyten, Chondrocyten, Myoblasten oder Osteoblasten zu differenzieren (Taylor, 1979). Die stabile Transfektion von Ror2-Varianten sollte demzufolge demonstrieren, inwieweit durch die

Interaktion mit endogenen Signalwegen, die osteo-/chondrogene Differenzierung dieser C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen beeinflusst wird.

Die Ergebnisse sowohl der histologischen Färbungen als auch der Analysen der entsprechenden Markergene zeigen, dass die Überexpression von Ror2wt allein keinen großen Einfluss auf die endogenen, an der osteo-/chondrogenen Differenzierung beteiligten Signalwege der C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen ausübt (siehe Kapitel 3.1.2). Im Gegensatz dazu konnte in den histologischen Färbungen der rekombinant BMP2-exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen (C3H10T $\frac{1}{2}$ _{BMP2}-Zellen) ein stimulatorischer Effekt auf die osteogene Entwicklung bedingt durch die Überexpression von Ror2wt beobachtet werden. Eine solche Stimulation konnte mit der intrazellulären Deletionsmutante Ror2 Δ C nicht gezeigt werden, sondern im Gegenteil scheint sich die Überexpression von Ror2 Δ C eher inhibitorisch auf die osteogene Differenzierung der C3H10T $\frac{1}{2}$ _{BMP2}-Zellen auszuwirken (Abbildung 16). Diese Ergebnisse würden dafür sprechen, dass Ror2 BMP2-abhängig die osteogene Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen fördert, aber eine Analyse der entsprechenden Markergene zeigt keine auffällige Veränderung der Expression in Gegenwart von überexprimierten Ror2-Varianten im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 19).

Die Überexpression von Ror2 allein führt demzufolge also nicht zu einer Beeinflussung der von uns untersuchten, endogenen Signalwege, die in einem veränderten Expressionsmuster von osteo-/chondrogenen Markergenen resultieren. Es kommt vielmehr zu einer Beeinflussung von Signalwegen, die in einer Veränderung der Zellen dahingehend resultieren, dass die BMP2-induzierte osteogene Differenzierung phänotypisch stärker zum Tragen kommt. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang z.B. eine Veränderung in der Kondensation der Zellen, an der Ror2 beteiligt sein könnte.

Andererseits bleibt festzuhalten, dass die rekombinante Expression der Ror2-Varianten innerhalb dieses Experiments im Vergleich zur endogenen Expression relativ gering ausfällt und dementsprechend auch die zu erwartenden Ror2-abhängigen Veränderungen sich nicht besonders stark auswirken dürften. Um möglichst unproblematisch eine höhere Expression von Ror2 allein oder auch in Kombination mit den interagierenden Faktoren, die im Rahmen dieser Doktorarbeit identifiziert werden konnten, in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen untersuchen zu können, wurde mit der Umklonierung relevanter Faktoren in adenovirale Expressionsvektoren begonnen (siehe Kapitel 3.6).

Die bisherigen Ergebnisse der Adenovirus-Experimente zeigen eine weitaus höhere Überexpression von Ror2wt im Vergleich zu den stabil transfizierten C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen (Abbildung 54). Allerdings konnte auch in diesen Fällen kein Einfluss der Überexpression von Ror2wt allein auf die osteo-/chondrogene Entwicklung der C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen festgestellt werden, während die adenovirale Überexpression von BMP2 wie gewohnt eine starke Induktion der Osteo- und Chondrogenese verursacht (Abbildung 55 A + B). Diese Ergebnisse bestätigen, dass Ror2 allein nicht in der Lage ist, die osteo-/chondrogene Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen einzuleiten, sondern seine Funktion möglicherweise eher darin besteht, die Einflüsse von anderen Faktoren (z.B. BMP2) zu verstärken. Eine Co-Expression von diesen Faktoren mit Ror2 in diversen Zelllinien wird in Zukunft durch die Verwendung von adenoviralen Expressionssystemen stark vereinfacht werden.

4.1.2 Ror2 stimuliert keine MAP-Kinase-Signalwege

Im Gegensatz zur Darstellung des Effektes einer Ror2-Überexpression auf zellulärer Ebene wie im Fall der osteo-/chondrogenen Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen können Signalwege auch auf molekularer Ebene untersucht werden. Da für die Mitglieder der Familie von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen bekannt ist, dass sie im allgemeinen an der Aktivierung von MAP-Kinase-Signalwegen (Mitogen-aktivierte Protein Kinase) und darüber hinaus diverse

MAP-Kinasen wie z.B. p38, JNK oder ERK an der Regulation der Osteo- und Chondrogenese beteiligt sind, sollten Vertreter dieser MAP-Kinasen gezielt auf die Aktivierung durch eine Ror2-Überexpression untersucht werden.

Eine Aktivierung von diversen MAP-Kinase-Signalwegen allein durch die Überexpression von Ror2 konnte von uns in HEK-Zellen nicht gezeigt werden (Abbildung 14). Auch die Interaktion von Ror2 mit anderen hier vorgestellten Faktoren (Wnts, TAK1, Bprp oder diverse Rezeptoren) führt nicht zur Veränderung der hier untersuchten MAP-Kinase-Signalwege (Abbildung 24 + 32). Zwar wird eine Stimulation der JNK-Aktivität durch TAK1wt oder Wnt-5a festgestellt, diese wird aber durch keine der hier zum Einsatz gekommenen Ror2-Varianten reproduzierbar positiv oder negativ reguliert.

Diese Ergebnisse widersprechen den Veröffentlichungen von Oishi et al. 2003, die eine Phosphorylierung von JNK durch die Überexpression von Ror2 zeigen konnten.

Bei der Bewertung dieser widersprüchlichen Ergebnisse gilt es allerdings zu berücksichtigen, dass sich die experimentellen Ansätze voneinander unterscheiden. Die Erkenntnisse von Minami et al. basieren auf der Phosphorylierung und Immunpräzipitation von überexprimiertem JNK, was ihnen erlaubte, auch geringe Effekte zu visualisieren. Wir gehen aufgrund unserer Ergebnisse davon aus, dass es sich bei der Phosphorylierung von JNK in Folge einer Überexpression von Ror2 nur um einen geringen Effekt handeln kann, dessen funktionelle Bedeutung erst noch aufgezeigt werden muss.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Überexpression von Ror2-Varianten allein weder zellulär in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen noch molekular in HEK293-Zellen zu einer signifikanten Stimulierung oder Inhibition der hier untersuchten Signalwege führt.

4.2 Physische und funktionelle Interaktionspartner von Ror2

Ein weiterer Ansatz zur Charakterisierung von Ror2-abhängigen Signalwegen ist demzufolge die Identifikation von physischen und funktionellen Interaktionspartnern von Ror2, die dazu beitragen können, dass Ror2 auf Signalwege Einfluss nimmt. Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte die Interaktion von Ror2 mit Proteinen aus unterschiedlichen Bereichen der Signaltransduktion (Liganden, Rezeptoren oder Signalmediatoren) aufgezeigt werden. Neben der inzwischen veröffentlichten Interaktion von Ror2 mit Vertretern der Wnt-Familie handelt es sich dabei um in diesem Zusammenhang bislang nicht beschriebene Faktoren wie Bprp, TAK1 oder diverse Rezeptoren der TGF- β - und FGF-Familie.

4.2.1 Ror2 interagiert mit den Wnt-Signalwegen

In den Veröffentlichungen von Hikasa et al., 2002 und Oishi et al., 2003 konnte neben der Interaktion von Ror2 mit Vertretern der Frizzled-Rezeptoren über die extrazellulären Cysteinreichen Domänen auch die Interaktion von Wnts mit diesem Bereich von Ror2 sowie die Aktivierung des nicht-kanonischen Wnt-Signalweges demonstriert werden.

Eine physische Interaktion von Vertretern der Wnt-Familie (kanonisch und nicht-kanonisch) mit den extrazellulären Domänen von Ror2 konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit bestätigt werden (Abbildung 39).

Für die Analyse einer funktionellen Interaktion von Ror2 mit den Wnt-Signalwegen existieren verschiedene experimentelle Modelle. In den Publikationen von Hikasa et al., 2002 und Oishi et al., 2003 wurden die Auswirkungen der Ror2-Überexpression auf die nicht-kanonischen Wnt-Signalwege anhand der konvergenten Ausdehnung von *Xenopus*-Embryonen aufgezeigt. Dabei konnte eine Stimulation des nicht-kanonischen Signalweges bereits durch die Überexpression von Ror2 allein dokumentiert werden, eine Stimulation, die durch die

zusätzliche Expression von nicht-kanonischen Vertretern der Wnt- und Frizzled-Rezeptoren-Familien synergistisch noch verstärkt wird.

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde ein anderes System zur Darstellung der Regulation von Wnt-Signalwegen gewählt, das auf einem spezifischen Reporter-Gen-Assay (Top-Flash) basiert. Dabei kann der kanonische Wnt-Signalweg in HEK-Zellen durch die Überexpression von Wnt-1 angeregt werden. Faktoren des nicht-kanonischen Signalweges wirken sich im Gegensatz dazu inhibierend auf die Aktivierung von TCF aus. Dementsprechend führt die Überexpression von Wnt-5a oder TAK1wt zu einer deutlichen Inhibition sowohl des endogenen als auch des durch Wnt-1-Überexpression stimulierten kanonischen Wnt-Signalweges in HEK-Zellen (Abbildung 43 + 44).

Die Überexpression von Ror2-Varianten allein in diesem Reporter-Gen-Assay führt dabei nicht zu einer signifikanten Ror2-abhängigen Stimulation oder Inhibition der Wnt-abhängigen Transkriptionsfaktoren. Diese Beobachtungen decken sich mit unseren bisherigen Schlussfolgerungen, dass die Überexpression von Ror2-Varianten allein nicht ausreicht, Ror2-abhängige endogene Signalwege zu aktivieren. Die Co-Expression mit Wnt-1 sollte darüber Aufschluss geben, ob Ror2 sich Liganden-abhängig auf den kanonischen Signalweg auswirkt. In der Tat zeigt die Co-Expression von Ror2wt oder einer seiner Deletionsmutanten deutliche Stimulierungen der Wnt-1-abhängigen Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges. Dabei konnten für die Ror2 Δ C-Mutante die weitaus stärksten Auswirkungen verzeichnet werden (Abbildung 44). Das erlaubt folgende Schlussfolgerungen:

Die Stimulierung der Wnt-1-abhängigen Aktivierung des kanonischen Signalweges durch Ror2 wird in erster Linie durch die Bindung von Wnt-1 an Ror2 im Bereich der extrazellulären Domänen von Ror2 vermittelt, weshalb die Co-Expression von Ror2 Δ Tyr, das nur aus den membrangebundenen extrazellulären Domänen besteht, bereits eine Stimulation auslösen kann.

Allerdings wird dieser Effekt durch die intrazelluläre Tyrosin-Kinase-Domäne wie in Ror2 Δ C noch deutlich verstärkt. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang, dass durch die Tyrosin-Kinase-Domäne weitere Faktoren aktiviert werden, die für die Signaltransduktion im kanonischen Wnt-Signalweg förderlich sind.

Die C-terminalen Serin-/Threonin- und Prolin-reichen Sequenzen hingegen inhibieren den durch die Tyrosin-Kinase-Domäne verursachten Effekt, auch wenn immer noch eine Erhöhung der Wnt-1-bedingten Stimulation erkennbar bleibt. Dies legt die Vermutung nahe, dass diese Domänen eher die Rolle eines negativen Regulators übernehmen, indem sie selbst oder durch die Interaktion mit intrazellulären Faktoren in diesem Bereich die stimulierende Aktivität der Tyrosin-Kinase-Domäne blockieren. Diese Ergebnisse würden dafür sprechen, dass Ror2 im kanonischen Wnt-Signalweg die Funktion eines Co-Rezeptor ausübt.

Besonders interessant sind diese Erkenntnisse, wenn man sie mit den Ergebnissen von Schwabe et al. vergleicht, die sich mit den Auswirkungen von Mutationen in Ror2 und der Ausprägung der Brachydaktylie Typ B sowie des Robinow-Syndroms beschäftigen. Demzufolge führen insbesondere Mutationen in Ror2, die einen Verlust der C-terminalen Serin-/Threonin- und Prolin-reichen Sequenzen zur Folge haben, zu den stärksten Ausprägungen der dominanten BDB, während die Ror2 Δ Tyr-Mutanten in ihrer Intensität weitaus geringer ausgeprägt sind (siehe Kapitel 1.2.3). Dies legt den Schluss nahe, dass die Wnt-1-abhängige Regulation des kanonischen Wnt-Signalweges durch Ror2 durch die Deletion der intrazellulären Domänen von Ror2 gestört wird und demzufolge eine zu hohe Aktivität des kanonischen Wnt-Signalweges in bestimmten Entwicklungsprozessen zu den BDB-typischen phänotypischen Ausprägungen führen könnte.

Wie bereits erwähnt weisen die Ergebnisse diverser Publikationen darauf hin, dass Ror2 insbesondere in den nicht-kanonischen Signalwegen eine Rolle spielt (siehe Kapitel 1.3.3). Die dokumentierte Interaktion von Ror2 mit TAK1wt könnte als weiterer Hinweis dafür angesehen werden, dass Ror2 auch in den nicht-kanonischen Wnt-Signalweg involviert ist. Die Untersuchung der Wnt-5a-abhängigen Stimulation des nicht-kanonischen Wnt-Signalweges durch Ror2 erfolgte hier durch die Inhibierung des kanonischen Signalweges.

Eine Stimulation des kanonischen Wnt-Signalweges kann durch die Zugabe von LiCl erreicht werden. Das LiCl inhibiert dabei die Kinaseaktivität von GSK-3 β und bewirkt dementsprechend eine Anreicherung von β -Catenin im Cytoplasma und im Nucleus (siehe Kapitel 1.3.3). Dementsprechend führt die Überexpression von Wnt-5a oder TAK1wt auch zu einer deutlichen Inhibition des durch LiCl-Zugabe stimulierten kanonischen Wnt-Signalweges in HEK-Zellen (Abbildung 46). Auch in diesem experimentellen Ansatz ließen sich die Ergebnisse von Taira et al. und Minami et al. nicht bestätigen. Der Einfluss von Ror2 auf die nicht-kanonischen Signalwege konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden. Die Verwendung von LiCl zur Stimulierung des kanonischen Wnt-Signalweges ist allerdings mit gewissen Bedenken verbunden, da LiCl nicht nur die Kinaseaktivität von GSK-3 β , sondern unter Umständen auch andere Kinasen in ihrer Aktivität beeinträchtigt und dadurch die Ergebnisse verfälschen könnten. Wir werden also in zukünftigen Experimenten den nicht-kanonischen Signalweg auf andere Weise aktivieren z.B. durch die Verwendung von Tumorzellen mit konstitutiv aktiven Komponenten aus Wnt-Signalwegen.

4.2.2 Ror2 interagiert mit diversen Rezeptoren

Neben einer möglichen Rolle als Co-Rezeptor des Wnt-Signalweges könnte Ror2 auch noch mit anderen Rezeptoren interagieren.

Unveröffentlichte Ergebnisse von Mundlos et al. (Charité, Berlin) deuten auf eine Interaktion von Ror2 mit dem Liganden GDF5 (Growth and Differentiation Factor 5) hin (pers. Mitteilung). GDF5 gehört zur TGF- β -Superfamilie, deren Mitglieder als sezernierte Signalmoleküle in eine Vielzahl von Wachstums- und Entwicklungsprozessen wie Zellproliferation, Differenzierung, Zellzyklusregulation, Apoptose, Gewebeumbau und –reperatur eingreifen. Gleiches gilt auch für BMP2, das in der Co-Expression mit Ror2wt in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen wie beschrieben zumindest in den histologischen Färbungen zu einer verstärkten Induktion der Osteogenese geführt hat. Vor dem Hintergrund der parallelen Einflüsse auf die osteo-/chondrogene Differenzierung in der Embryonalentwicklung wurde die Hypothese einer Funktion von Ror2 als Co-Rezeptor zu Vertretern der TGF- β -R- oder FGFR-Familien (Transforming Growth Factor β Receptor, Fibroblast Growth Factor Receptor) aufgestellt. Normalerweise erfolgt die Signaltransduktion über die Bildung heteromerer (TGF- β -R) oder homomerer (FGFR) Rezeptorkomplexe. Dabei gehören die Typ I- und Typ II-Rezeptoren der TGF- β -Signalwege zur Gruppe der Serin-/Threonin-Kinase Rezeptoren, während die FGFRs zur Gruppe der Tyrosin-Kinase-Rezeptoren gezählt werden.

Im Rahmen von Co-Immunpräzipitation-Experimenten konnte die Interaktion von Ror2 mit einer großen Anzahl von Rezeptoren über die intrazellulären Domänen dokumentiert werden (Abbildung 26). Besonders stark ausgeprägt war diese Interaktion mit den Vertretern der FGFRs (FGFR2, FGFR3) und den Typ II-Rezeptoren der TGF- β -Familie (TGF- β -R II, ActR II), während die Interaktion mit den konstitutiv aktiven Typ I-Rezeptoren deutlich schwächer ausgeprägt war.

Da Ror2 demzufolge keine bestimmte Präferenz für einen Rezeptor zuzuordnen ist, bleibt anzunehmen, dass Ror2 in einer möglichen Funktion als Co-Rezeptor an vielen verschiedenen Signalwegen beteiligt und nicht ausschließlich auf die Wnt-Signalwege begrenzt ist. Um an

dieser Stelle eine definitive Aussage über die Beteiligung von Ror2 als Co-Rezeptor an diesen Signalwegen treffen zu können, müsste allerdings die ligandenabhängige Aktivierung noch gezeigt werden.

4.2.3 Ror2 interagiert mit Signalmediatoren

Die Liganden-abhängige Aktivierung von Ror2 oder auch Ror2-regulierter Rezeptor-Komplexe und die daraus resultierende Beeinflussung von Signalwegen impliziert auch eine mögliche Interaktion mit intrazellulären Signalmediatoren. Im Rahmen dieser Dissertation konnte in diesem Zusammenhang die Interaktion von Ror2 sowohl mit Bprp als auch mit TAK1 gezeigt werden.

Dabei wurde zunächst in einem Yeast Two Hybrid Screen Bprp als Ror2-interagierender Faktor identifiziert. Bprp ist ein prolin-reiches Protein, das ursprünglich als Interaktionspartner der humanen RNA-bindenden DAZ (deleted in Azoospermia)-Gen-Familie beschrieben wurde. Neben dem „full-length“ Protein wurde auch der verkürzte C-terminale Teil von Bprp als interagierend charakterisiert. Spätere Analysen im Rahmen von Co-Immunpräzipitationsexperimenten in HEK293-Zellen bestätigten eine Interaktion des C-Terminus von Bprp mit Ror2 und identifizierten die C-terminalen Serin-/Threonin- und Prolin-reichen Domänen von Ror2 als Bindungsstelle für Bprp (Abbildung 22).

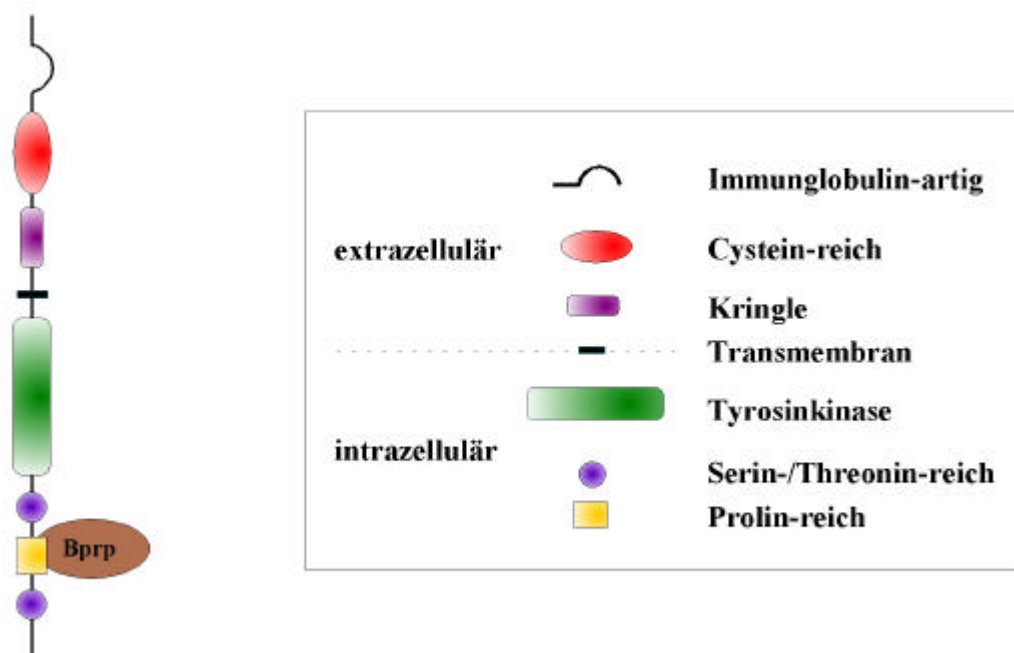


Abbildung 56: Ror2 interagiert mit Bprp

Dargestellt ist die physische Interaktion von Bprp mit dem C-Terminus von Ror2 basierend auf den Ergebnissen des Yeast-Two-Hybrid-Screens und der Co-Immunpräzipitationen in HEK293-Zellen

Aufgrund der geringen Informationen über Bprp und seiner Funktion in der Zelle sind Schlussfolgerungen aus einer Interaktion mit Ror2 natürlich nur schwer möglich. Auffällig ist allerdings, dass Ror2 und Bprp ein gemeinsames Expressionsmuster aufweisen. So wird Bprp zwar ubiquitär exprimiert, besonders hohe Expressionsraten konnten allerdings vergleichbar mit Ror2 im Gehirn und Knochen beobachtet werden. Dabei ist die Expression von Bprp in Osteoblasten serum-induziert und von der Adhäsion und Interaktion der Zellen mit der Zellmatrix abhängig. Vergleiche mit der Domänenstruktur anderer Proteine zeigen die Möglichkeit einer „paired-box“-Domäne, die zusammen mit der bevorzugten Lokalisation

von Bprp im Cytoplasma auf eine Funktion als Transkriptions-Coaktivator schließen lassen (siehe Kapitel 3.3.6).

Für eine Funktion als Coaktivator sprechen auch unsere Ergebnisse aus den Top-Flash-Experimenten, die zeigen, dass die Bprp-Überexpression zu einer deutlichen Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges führt. Diese Stimulation ist im Gegensatz zu den Ergebnissen der Ror2-Überexpression sowohl bei den endogenen als auch bei den durch Wnt-1- oder LiCl-stimulierten kanonischen Wnt-Signalwegen zu beobachten und offenbar Ror2-unabhängig. Dabei trägt es jedoch zur Verstärkung der Ror2-Effekte bei.

4.2.4 TAK1 interagiert mit Bprp und Ror2

Zusätzlich zur Interaktion mit Ror2 konnte aber auch die Interaktion von Bprp mit TAK1 in der Co-Immunpräzipitation gezeigt werden. Eine Verbindung von Ror2 mit TAK1 erscheint in sofern naheliegend, als dass die MAP3Kinase (mitogen aktivierte Protein-Kinase-Kinase) TAK1 (TGF- β aktivierte Kinase 1) als Signalmediator ein zentraler Bestandteil diverser Signalwege ist, die an der Differenzierung der Zelle beteiligt sind. So konnte neben den TGF- β -Signalwegen (Moriguchi, 1996; Wang, 1997) auch eine entscheidende Rolle von TAK1 im nicht-kanonischen Wnt-Signalweg beschrieben werden (Ishitani, 1999). Darüber hinaus wirken sich auch Liganden aus dem inflammatorisch/infektiösen Bereich auf die TAK1-Aktivierung aus, wie z.B. IL-1, TNF- α oder über sogenannte Toll-like Rezeptoren auch Lipopolysaccharide (LPS), dsRNA, etc. (Sakurai, 1998; Ninomiya-Tsuji, 1999; Sakurai, 1999).

Durch Co-Immunpräzipitation in HEK-Zellen konnten wir erstmalig zeigen, dass aktives TAK1 im Gegensatz zur dominant negativen Punktmutante TAK1dn mit Ror2 interagiert. Der C-terminale Bereich von Ror2 mit seinen Serin-/Threonin- und Prolin-reichen Domänen wurde wie zuvor bei Bprp auch hier als der für diese Interaktion relevante Bereich identifiziert. Diese physische Interaktion von überexprimierten Partnern konnte allerdings bisher weder endogen in unterschiedlichen Zelllinien noch im Two-Hybrid-System in Hefen bestätigt werden (Daten nicht gezeigt), was darauf hindeutet, dass die Interaktion von Ror2 und TAK1 möglicherweise nicht direkt, sondern indirekt über endogene Partner (X) vermittelt wird. In diesem Zusammenhang muss man unwillkürlich wieder an das sowohl mit Ror2 als auch mit TAK1 interagierende Bprp denken.

An der Interaktion mit beiden Faktoren ist schließlich das Serin-/Threonin- und Prolin-reiche C-terminale Ende von Ror2 beteiligt. Auch eine Interaktion von Bprp mit aktivem TAK1 konnte in der Co-IP in HEK-Zellen aufgezeigt werden, allerdings war auch hier eine Interaktion im Yeast Two Hybrid System nicht nachzuweisen.

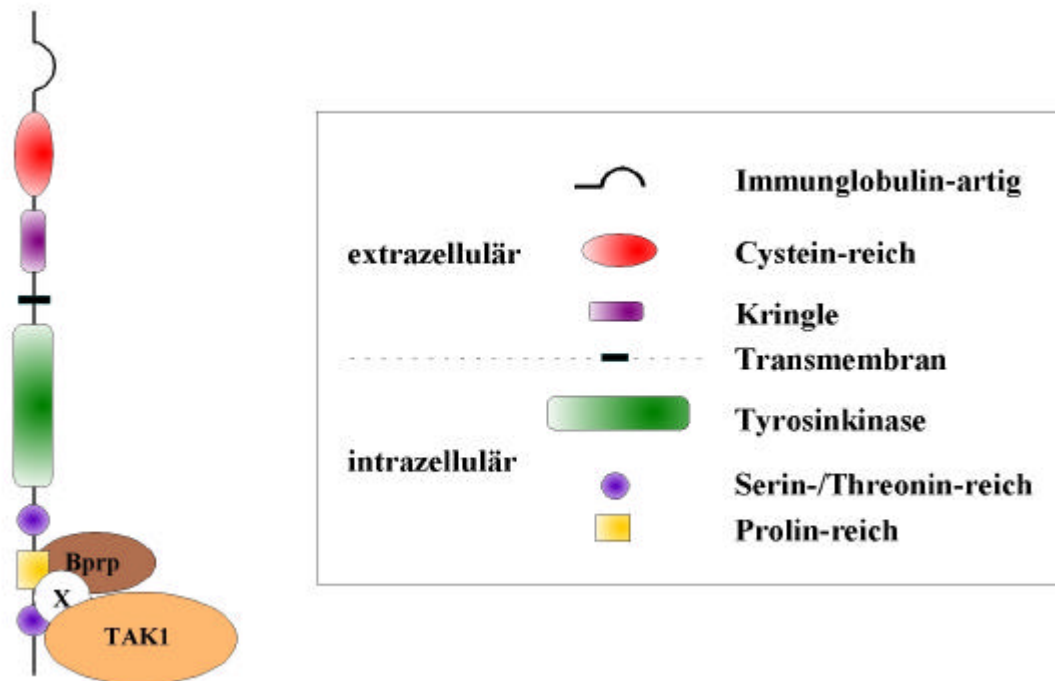


Abbildung 57: Ror2 interagiert mit TAK1wt

Dargestellt ist die physische Interaktion von TAK1wt mit dem C-Terminus von Ror2 basierend auf den Ergebnissen der Co-Immunpräzipitationen in HEK293-Zellen. Vermittelt wird diese Interaktion wahrscheinlich über bislang nicht identifizierte Faktoren (X) und ist dabei unabhängig von der Bindung von Bprp an Ror2 im gleichen Bereich.

Zusammenfassend lässt sich deshalb schließen, dass Bprp und TAK1 unabhängig voneinander in der Lage sind, mit einem gemeinsamen Bereich von Ror2 gleichzeitig zu interagieren, ohne dabei die physische Interaktion des jeweils anderen Interaktionspartners zu stören oder zu fördern. Es deutet folglich nichts darauf hin, dass die Bindung von TAK1 an Ror2 Bprp-vermittelt zustande kommt. Vielmehr ist davon auszugehen, dass die in der Co-Immunpräzipitation beobachtete Interaktion von TAK1 mit Bprp möglicherweise durch endogenes Ror2 und andere bislang unbekannte endogene Faktoren vermittelt wird.

4.3 Funktionelle Analysen der Interaktion

4.3.1 Die Interaktion von Ror2 mit TAK1 wird Wnt-1-abhängig inhibiert

Mit den bedeutendsten Befund dieser Dissertation stellt die Beobachtung einer Inhibition der intrazellulären Interaktion von Ror2 mit TAK1 durch die gleichzeitige extrazelluläre Bindung von Wnts dar. Dabei fällt auf, dass diese Konkurrenz vorwiegend mit dem Vertreter der kanonischen Wnt-Familie (Wnt-1) auftritt, während Wnt-5a eine weitaus geringere Ausprägung aufzeigt (Abbildung 40 + 41).

Betrachtet man diese Ergebnisse vor dem Hintergrund, dass Wnt-5a und TAK1 Mitglieder des nicht-kanonischen Wnt-Signalweges sind, kann man zu dem Schluss kommen, dass eine Ror2-vermittelte Stimulation des nicht-kanonischen Signalweges über TAK1 in Gegenwart von Wnt-5a zustande kommen kann. Dieses Interaktionsmodell wäre eine Erklärung für die von Hikasa et al., 2002 und Oishi et al., 2003 beschriebene Aktivierung des nicht-kanonischen Signalweges und von JNK. Eine solche Konstellation konnte im Rahmen dieser Dissertation aufgrund der starken Autophosphorylierung von TAK1 und den daraus resultierenden Auswirkungen auf die Phosphorylierung von MAP-Kinasen und den Reporter-

Assay allerdings nicht nachgewiesen werden, da die eventuell sehr geringen Ror2-Effekte durch die stärkeren Auswirkungen der TAK1-Aktivität überlagert werden.

Andererseits verhindert die Gegenwart von Wnt-1 eine Interaktion mit TAK1 und somit eine Einbindung in den nicht-kanonischen Signalweg. Stattdessen kommt die Funktion von Ror2 im kanonischen Wnt-Signalweg zum Tragen, wo es möglicherweise ebenfalls als Co-Rezeptor eine stimulierende Wirkung ausübt. Die Einbindung von Ror2 in die beiden gegensätzlich wirkenden Wnt-Signalwege könnte demzufolge also von der Zusammensetzung der auf die Zelle einwirkenden Wnts abhängig sein.

Interessant ist in diesem Zusammenhang noch zu erwähnen, dass die Verdrängung von TAK1 durch Wnt-1 auch durch steigende Mengen an Wnt-5a nicht rückgängig gemacht werden kann, was für eine stärkere Bedeutung des kanonischen Wnt-Signalweges spricht (Abbildung 42).

4.3.2 TAK1wt phosphoryliert Ror2

Wir haben keine Hinweise dafür finden können, dass Ror2 in seiner Funktion als Rezeptor an der Aktivierung des Signalmediators TAK1 und damit an der Regulation von MAP-Kinase-Signalwegen oder einer Stimulation der nicht-kanonischen Wnt-Signalwege beteiligt ist. Die widersprüchlichen Ergebnisse von Hikasa et al. und Oishi et al. im Hinblick auf die Aktivierung von JNK und des nicht-kanonischen Wnt-Signalweges würden allerdings für eine solche Rolle sprechen, weswegen weitere Experimente durchaus sinnvoll erscheinen.

Neben dieser ungeklärten Frage konnte im Rahmen dieser Dissertation aber nachgewiesen werden, dass TAK1 Ror2 modifiziert. Die Interaktion von TAK1wt mit Ror2 führt zu einer Phosphorylierung, die durch Phosphorylierung-spezifische Antikörper erkannt werden kann. Die Erkennungssequenz dieses Antikörpers (...T*GY*...) ebenso wie die Lokalisation der Interaktion von Ror2 mit TAK1wt im Bereich der Serin-/Threonin- und Prolin-reichen Domänen von Ror2 und die Beobachtung, dass nur Ror2-Varianten mit intakten intrazellulären Domänen von diesem Phänomen betroffen waren, legen eine Phosphorylierung in einem C-terminalen TGY-Motif von Ror2 nahe. In der Tat konnte die Phosphorylierung von Ror2 bzw. die Erkennung des doppelt-phosphorylierten Ror2 mit dem verwendeten Antikörper durch Punktmutation in diesem TGY-Motif unterbunden werden, ohne die Interaktion von Ror2 mit TAK1wt zu inhibieren. TAK1 in seiner Funktion als Serin-/Threonin-Kinase kommt dabei wahrscheinlich die Phosphorylierung des Threonin-Restes zu, während die Phosphorylierung des Tyrosin-Restes auf Ror2 zurückzuführen ist (Abbildung 33 + 35). In jedem Fall scheint die Tyrosinphosphorylierung von der Interaktion mit TAK1wt bzw. der dadurch bedingten Threoninphosphorylierung abhängig zu sein, da eine Autophosphorylierung von Tyrosin-Resten in Abwesenheit von TAK1wt nicht festgestellt werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Eine aktuelle Veröffentlichung auf dem Gebiet der Ror2-Forschung demonstriert, dass dieses Prinzip der funktionellen Interaktion im Zusammenhang mit Ror2 möglicherweise nicht ungewöhnlich ist. Kani et al. (2004) konnten zeigen, dass die Casein Kinase Iε (CKIε) im Bereich der c-terminalen Prolin-reichen Domäne mit Ror2 interagiert. In der Folge dieser Interaktion wird Ror2 durch die funktionell aktive CKIε an nicht näher definierten Serin-/Threonin-Resten innerhalb der distalen Serin-/Threonin-Domäne phosphoryliert. Entgegen einiger anderer Beispiele in der Literatur führt diese Serin-/Threonin-Phosphorylierung allerdings nicht zu einer Herabsetzung der Autophosphorylierung der RTK (Barbier et al., 1999; Hunter et al., 1984), sondern es kommt im Gegenteil erst dadurch zu einer Autophosphorylierung von Tyrosin-Resten innerhalb der Prolin-reichen Domäne von Ror2. Diese Ergebnisse weisen erstaunliche Parallelen zu dem von uns dokumentierten Zusammenspiel von Ror2 mit TAK1 auf (Abbildung 33 + 35).

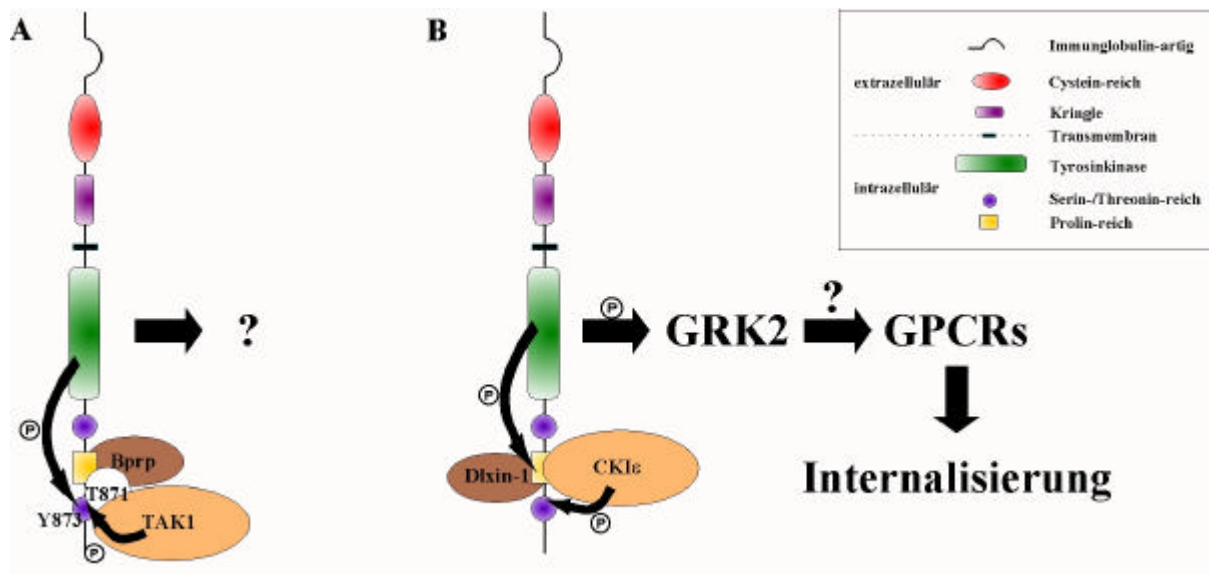


Abbildung 58: Gegenüberstellung der Interaktion von Ror2 mit verschiedenen Kinasen

Die Interaktion von Ror2 mit TAK1wt einerseits (Bild A) und CK1ε andererseits (Bild B) weisen sowohl physisch als auch funktionell einige Parallelen auf. Die Interaktion beider Kinasen ist in den C-terminalen Serin-/Threonin- und Prolin-reichen Domänen von Ror2 lokalisiert und führen beide zur Phosphorylierung von Ror2. Dabei werden sie auch durch andere Faktoren, die an ähnliche Sequenzen in Ror2 binden, nicht gestört (Bprp – Bild A/ Dlxin-1 – Bild B).

Die funktionelle Bedeutung der von uns dokumentierten Phosphorylierung konnte bislang nicht geklärt werden. Sie kann allerdings durch diverse Interaktionspartner von Ror2 positiv oder negativ beeinflusst werden.

So führt die Co-Expression von Wnt-1 zum vollständigen Verlust der Phosphorylierung, was nicht weiter verwundert, da diese Phosphorylierung auf die Interaktion von Ror2 mit TAK1wt zurückzuführen ist und diese Interaktion durch die Bindung von Wnt-1 nicht länger stattfindet (Abbildung 40).

Die Co-Expression von Bprp hingegen fördert zwar nicht erkennbar die Interaktion von Ror2 mit TAK1wt, verstärkt dafür aber deutlich die aus dieser Verbindung resultierende Phosphorylierung von Ror2. Da eine Kinaseaktivität für Bprp nicht beschrieben ist und von uns auch nicht gezeigt werden konnte (unveröffentlichte Daten), liegt der Schluss nahe, dass es sich bei Bprp um ein Protein handelt, welches die eigentliche enzymatische Wirkung eines anderen Proteins auf das Substrat durch ihre Interaktion mit den beiden Partnern fördert (Abbildung 36).

Die Arbeitsgruppe von Kani et al. konnte darüber hinaus noch weitere Hinweise auf eine mögliche biologische Funktion der von ihnen dokumentierten Interaktion aufzeigen. Mit der Autophosphorylierung von RTKs ist in der Regel auch ihre Tyrosin-Kinase-Aktivität verbunden. Auf der Suche nach dem Substrat der Tyrosin-Kinase von Ror2 stießen sie auf die G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Kinase 2 (GRK2), die als Schlüssel-Mediator an der Internalisierung von G-Protein-gekoppelten 7-Transmembran-Rezeptoren (GPCRs) beteiligt ist, zu denen unter anderem auch die Frizzled-Rezeptoren der Wnt-Signalwege gehören (Pitcher et al., 1998).

Dieser Einfluss auf die Internalisierung und damit verbunden auf den Abbau von Rezeptoren und Rezeptor-Komplexen könnte wiederum dazu beitragen, mögliche Erklärungen für unsere weitere Beobachtungen im Zusammenspiel von TAK1wt mit Ror2 zu finden:

So konnte beobachtet werden, dass sich in Anwesenheit von TAK1wt die Lokalisation von Ror2 von der Zelloberfläche hin zu kernnahen Cytoplasma-Regionen verändert (Abbildung 38). Darüber hinaus konnte auch eine Größenreduktion von Ror2 in der Gegenwart von TAK1wt beobachtet werden, die darauf hindeutet, dass TAK1 auch über die Glykosylierung von Ror2 an der korrekten Positionierung von Ror2 an der Oberfläche beteiligt sein könnte (Abbildung 37).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass unsere funktionellen Analysen zusammen mit den Erkenntnissen aus der Literatur die Wnt-Signalwege als Ror2-abhängig reguliert charakterisieren. Dabei kommen mehrere klar voneinander zu unterscheidende Funktionen von Ror2 zum Tragen:

- Ror2 ist wahrscheinlich als Co-Rezeptor an der Signaltransduktion innerhalb des kanonischen und des nicht-kanonischen Signalweges beteiligt.
- Dabei hängt die Funktion von der Klasse der mit Ror2 interagierenden Wnts ab.
- Die Stimulation des kanonischen Wnt-Signalweges ist abhängig von der extrazellulären Bindung von Wnt-1 und der intrazellulären Aktivität der Tyrosinkinase-Domäne.
- Ror2 könnte auch an der korrekten Präsentation von anderen Rezeptoren wie denen der Frizzled-Familie (z.B. durch Internalisierung) beteiligt sein.
- Die Rolle der Interaktion mit Bprp ist in diesem Zusammenhang noch nicht endgültig geklärt, es spricht aber aufgrund der Aktivität von Bprp einiges dafür, dass auch diese Interaktion im Zusammenhang mit den Wnt-Signalwegen zu sehen ist.

Neben dieser Regulation der Wnt-Signalwege durch Ror2 sind aber auch Beteiligungen an anderen Signalwegen aufgrund der Interaktion mit diversen Rezeptoren (vielleicht auch in Form eines Co-Rezeptors) durchaus denkbar.

5 Zusammenfassung

Distinkte Mutationen in der Rezeptor-Tyrosinkinase Ror2 (Regeneron orphan receptor 2) resultieren u.a. in schweren skelettalen Fehlbildungen wie der dominanten Brachydactylie Typ B (BDB) oder dem rezessiven Robinow-Syndrom. Trotz des Wissens über die Funktion von Ror2 und die Auswirkungen von Mutationen auf die Embryonalentwicklung in vielen Organismen ist nur sehr wenig über die Signalwege bekannt, in die Ror2 involviert ist.

Im Verlauf dieser Doktorarbeit konnten Interaktionen von Ror2 mit Liganden, Rezeptoren, und Signalmediatoren aufgezeigt werden. Insbesondere die Identifizierung von mehreren bis heute nicht in diesem Zusammenhang beschriebenen Interaktionspartnern weist auf eine Vielzahl von Signalwegen hin, in die Ror2 involviert sein könnte. Dabei konnten neben der physischen Interaktion von Ror2 auch funktionelle Auswirkungen dieser Interaktionen beobachtet werden.

So wurde Bprp (basic proline-rich protein) im Yeast Two Hybrid System als ein neuer interagierender Faktor von Ror2 identifiziert. Diese Interaktion konnte auf die C-terminalen Serin-/Threonin- und Prolin-reichen Sequenzen von Ror2 eingegrenzt werden. Es handelt sich hierbei um ein Prolin-reiches Protein, welches im Knochen, aber auch im Gehirn und Herzen stark exprimiert wird.

Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Bprp zu einer Stimulierung des kanonischen Wnt-Signalweges in Säuger-Zelllinien führt. Die Fähigkeit von Bprp sowohl eine Interaktion mit TAK1 (TGF- β -aktivierte Kinase 1) als auch Ror2 einzugehen und die TAK1-abhängige Phosphorylierung von Ror2 zu verstärken, legen den Schluß nahe, daß es sich bei Bprp um eine Art Adaptermolekül handelt, welches die Bindung diverser Signalmoleküle untereinander verstärkt und dadurch die betroffenen Signalwege fördert.

Die MAP3K TAK1 wurde als neuer Interaktionspartner von Ror2 nachgewiesen. TAK1 ist in seiner Funktion als Signalmediator von Signalwegen der Differenzierung und der Infektion/Inflammation eingehend beschrieben. Seine Überexpression führt zur Aktivierung diverser MAP-Kinase-Signalwege oder zur Inhibierung des kanonischen Wnt-Signalweges. Diese Aktivitäten von TAK1 werden nicht von der Interaktion mit Ror2 beeinflusst. Jedoch beeinflusst diese Interaktion die posttranslationale Modifikation von Ror2 an einem Threonin-Rest im Bereich der C-terminalen Domänen. Wie bereits erwähnt kann diese TAK1-abhängige Phosphorylierung durch einen weiteren Interaktionspartner von Ror2 (Bprp) positiv beeinflusst werden. Unsere Ergebnisse von immunhistologischen Untersuchungen lassen darauf schließen, dass TAK1 einen Einfluß auf die Internalisierung und damit die korrekte Präsentation von Ror2 an der Zelloberfläche ausüben könnte.

Die Interaktion von Ror2 über seine intrazellulären Domänen mit anderen Rezeptoren, die an der Knochen- und Knorpelbildung beteiligt sind, insbesondere mit den FGFRs (Fibroblast Growth Factor Receptor) und den Typ II-Rezeptoren der TGF- β -Superfamilie deuten an, daß Ror2 in diesen Signalwegen eine regulatorische Rolle z.B. in Form eines Co-Rezeptors einnehmen könnte.

In einem Wnt-abhängigen Reporter-System konnte gezeigt werden, daß die Bindung von Wnt-1 an Ror2 zu einer Stimulierung des kanonischen Wnt-Signalweges führt. Weiterhin führt die Deletion der C-terminalen Serin-/Threonin- und Prolin-reichen Sequenzen zu einer stark erhöhten Stimulation des kanonischen Wnt-Signalweges. Die zusätzliche Deletion der Tyrosin-Kinase-Domäne hingegen hebt diesen Effekt fast vollständig wieder auf. Diese Beobachtungen erlauben Rückschlüsse auf die Rolle von Ror2 bei verschiedenen schweren Ausprägungen von Brachydactylie Typ B.

Meine Ergebnisse zusammen mit den Erkenntnissen aus der Literatur weisen darauf hin, daß Ror2 in den Wnt-Signalwegen mehrere voneinander abzugrenzende Funktionen (Signaltransduktion/ Internalisierung von Rezeptoren) ausübt und dadurch auf unterschiedliche Weise diese Signalwege beeinflußt.

Um darüber hinaus eine Relevanz dieser Interaktionen von Ror2 mit Vertretern der Wnt-Signalwege, den diversen Rezeptoren und/oder Bprp auf die embryonale Knochen- und Knorpelentwicklung zu demonstrieren, werden die diversen Interaktionspartner zur Zeit in Adenovirus-Vektoren umklontiert. Anschließend sollen verschiedene osteo-/chondrogene Progenitor-Zelllinien mit diesen Adenovirus-Konstrukten infiziert und die daraus resultierenden Veränderungen in der Osteo-/Chondrogenese dieser Zelllinien anhand von histologischen Färbungen und Markergenanalysen dokumentiert werden, um auf diese Weise einen besseren Einblick in den Aufbau und die Funktion von Ror2-abhängigen Signalwegen zu ermöglichen.

6 Anhang

6.1 Eingesetzte Oligonukleotide

NR	NAME	SEQUENZ (5'® 3')	VERWENDUNG
850	MHPRT 5'	GCTGGTGAAAAGGACCTCT	HPRT -Abgleich
849	MHPRT 3'	CACAGGACTAGAACACCTGC	HPRT -Abgleich
1251	ROR INT2 FWD	GAAAGTTCTCCATCGACTCTG	Nachweis von stabil transfiziertem Ror2wt, Ror2ΔC; Sequenzierung der Chimäre; Nachweis des in pcDNA3 klonierten Ror2Cterm; Sequenzierung von Ror2Cterm; Sequenzierung der Punktmutanten
793	SP6 PCDNA REV	CATTTAGGTGACACTATAG	Nachweis von stabil transfiziertem Ror2wt, Ror2ΔC; Nachweis des in pcDNA3 klonierten Ror2Cterm
1037	COL-2A1 5'	CCTGTCTGCTTCTTGTAAGAAC	Nachweis von Kollagen Typ II
353	COL-2A1 3'	AGCATCTGTAGGGGTCTTCT	Nachweis von Kollagen Typ II
823	SOX9 UPPER	TGCAAGCCGACTCCCCACATT CCT	Nachweis von SOX9
824	SOX9 LOWER	GGCGCCTGCTGCTTCGACATC CAC	Nachweis von SOX9
822	FGF3 REZEPTOR 5' Mouse	CCTGCGCAGTCCCCCAAAGAA G	Nachweis des FGF3-Rezeptors
821	FGF3 REZEPTOR 3' Mouse	CTGCAGGCATCAAAGGAGTAG T	Nachweis des FGF3-Rezeptors
1036	COL-1A1 5'	GCCCTGCCTGCTTCGTG	Nachweis von Kollagen Typ I
1035	COL-1A1 3'	TTTTTGGTAAGGTTGAATGC	Nachweis von Kollagen Typ I
406	OSTEOCALCIN 5'	GCAGACCTAGCAGACACCAT	Nachweis von Osteocalcin
405	OSTEOCALCIN 3'	GAGCTGCTGTGACATCCATAC	Nachweis von Osteocalcin
1265	CSF1R 5'	CAGATCTAGAGCCACCATGGG CCCAGGAGTTCTGCTGCTC	Herstellung des N-terminalen Teils der Chimäre (extrazellulärer CSF1R-Teil)
1266	CSF1R 3'	CTCATCCGGGGGATGCGTGTG TGGGC	Herstellung des N-terminalen Teils der Chimäre (extrazellulärer CSF1R-Teil)
1259	ROR2 TM	GCCCACACGCATCCCCCGGAT GAGATTCTGTACATCCTGGTC CCCAGC	Herstellung des C-terminalen Teils der Chimäre (intrazellulärer Ror2-Teil); Sequenzierung der Punktmutanten
1260	ROR2 3'	CAGACTCGAGTCAGGCTTCAA GCTGGACATGAGC	Herstellung des C-terminalen Teils der Chimäre (intrazellulärer Ror2-Teil)
1263	CHIM FWD	TATAGCGGCCGCGCCACCATG GGCCAGGAGTTCTGCTGCTC	Klonierung der Chimäre in pMT7T3-Vektor
1264	CHIM REV	TATAGTCGACTCATCACTTGT CATCGTCATCCTTGTAGTCGG CTTCAAGCTGGACATGAGC	Klonierung der Chimäre in pMT7T3-Vektor
515	T7	TTAGTCTTTTGTCTTTTATT TCA	pMT7T3f _i 5'-Primer; Sequenzierung der Chimäre
514	T3	GATCGAAGCTCAATTAACCCT CAC	pMT7T3f _i 3'-Primer; Nachweis der in pMT7T3 klonierten Chimäre; Sequenzierung der Chimäre
1267	CSF1R INT1 FWD	CCACAGGGCCAAGTTCATTCA G	Sequenzierung der Chimäre
1268	CSF1R INT1 REV	CTGAATGAACTTGGCCCTGTG G	Sequenzierung der Chimäre

1269	CSF1R INT2 FWD	GCCTGCAAGGTTTTAACTGG	Sequenzierung der Chimäre
1270	CSF1R INT2 REV	CCAGTTAAAACCTTGCAGGC	Sequenzierung der Chimäre
1249	ROR INT1 FWD	CTGTCTCCTAGGCGTCGTGA	Sequenzierung der Chimäre; Sequenzierung von Ror2Cterm; Sequenzierung der Punktmutanten
1250	ROR INT1 REV	GTCACGACGCCTAGGAGACAG	Sequenzierung der Chimäre
1252	ROR INT2 REV	CAGAGTCGATGGAGAACTTTC	Sequenzierung der Chimäre
1253	ROR INT3 FWD	GTTTCATCCCCATGAAGGGTCA G	Nachweis der in pMT7T3 klonierten Chimäre; Sequenzierung der Chimäre; Sequenzierung von Ror2Cterm; Sequenzierung der Punktmutanten
1271	ROR INT6 FWD	GAGGTTTCATGGAGGAGCTCGG GGA	Sequenzierung der Chimäre
627	BD-ROR-FWD neu	TATACATATGACACCCTGGAC GGCAGGTGAAGTG	Klonierung von Ror2 in BD-Vektor
641	EXT REV	TATAGTCGACTCACCCCATCT TGCTGCCATATCGGGG	Klonierung von Ror2 in BD-Vektor
642	INT FWD	TATACATATGCGCAACAAACA GAAGGCTTCGGCC	Klonierung von Ror2 in BD-Vektor
626	BD-ROR-REV	TATAGTCGACTCAGGCTTCAA GCTGGACATGAGC	Klonierung von Ror2 in BD-Vektor
555	BD INSERT FWD	TCATCGGAAGAGAGTAG	Sequenzierung von Ror2-N und Ror2-C in pGBKT7
556	BD INSERT REV	CGTTTTAAAACCTAAGAGTCA C	Sequenzierung von Ror2-N und Ror2-C in pGBKT7
1099	T7 ADII HA	ATACGATGTTCCAGATTACG	Sequenzierung der cDNA-Bank in pACT2; Amplifikation der Inserts in pACT2
554	AD INSERT REV	GTGAACTTGCGGGGTTTTTCA GTATCTACGAT	Sequenzierung der cDNA-Bank in pACT2; Amplifikation der Inserts in pACT2
984	LYSYL OXIDASE MU	GTCAGGATCCGCCACCATGCG TTTCGCCTGGGCTGTG	Klonierung von Lox in pcDNA3-Vektor
985	LYSYL OXIDASE MU3	GAATCTCGAGCTACTAAGCGT AATCTGGAACATCGTATGGGT AATACGGTGAAATTGTGC	Klonierung von Lox in pcDNA3-Vektor
1001	GALECTIN-3-3' HA- XHO	CGAGCTCGAGTTATTAAGCGT AATCTGGAACATCGTATGGGT AGATCATGGCGTGTTAG	Klonierung von Galectin 3 in pcDNA3-Vektor
1002	GALECTIN-3-5' BAMHI	GTCAGGATCCGCCACCATGGC AGACAGCTTTTCGCTTAAC	Klonierung von Galectin 3 in pcDNA3-Vektor
982	FIBULIN 5 HA MU3	GCTGGAATTCTCAAGCGTAAT CTGGAACATCGTATGGGTAGA ACGGATACTGCGACACAT	Klonierung von Fibulin-5 in pcDNA3-Vektor
983	FIBULIN 5 MU5	GTCAAAGCTTGCCACCATGCC AGGATTAAAAAGGATAC	Klonierung von Fibulin-5 in pcDNA3-Vektor
1054	BPRP FWD	GTCACCTCGAGATGAACAGCAA AGGTCAATATC	Klonierung von Bprp in pCS3-Vektor; Nachweis von Bprp
1055	BPRP REV	GATATCTAGATCACCAAATGG TGTAGCCACCATTG	Klonierung von Bprp in pCS3-Vektor; Nachweis von Bprp
1156	BPRPINT F	GTCACCTCGAGCATCCAGGGGC TGCCACAGTC	Klonierung von BprpΔN in pCS3-Vektor
1014	LOX INT1 FWD	GCGCGCGGCGAACCGGACTGC ATC	Sequenzierung der Lysyl-Oxidase in pcDNA3
1016	LOX INT1 REV	GATGCAGTCCGGTTCGCCGCG CGC	Sequenzierung der Lysyl-Oxidase in pcDNA3
1015	LOX INT2 FWD	CTTACCAAGCCGCCCTCGGTAC C	Sequenzierung der Lysyl-Oxidase in pcDNA3
1017	LOX INT2 REV	GTACCGAGGGCGGCTTGGTAA G	Sequenzierung der Lysyl-Oxidase in pcDNA3
1018	L34 INT FWD	GGTGCCCTATGACCTGCCCTT G	Sequenzierung von Galectin 3 in pcDNA3

1019	L34 INT REV	CAAGGGCAGGTCATAGGGCAC C	Sequenzierung von Galectin 3 in pcDNA3
1006	FIB INT1 FWD	GAAGGAGGTTACACCTGCTC	Sequenzierung von Fibulin-5 in pcDNA3
1008	FIB INT1 REV	GAGCAGGTGTAACCTCCTTC	Sequenzierung von Fibulin-5 in pcDNA3
1007	FIB INT2 FWD	CACGTGTACCTCACTGCAGAC	Sequenzierung von Fibulin-5 in pcDNA3
1009	FIB INT2 REV	GTCTGCAGTGAGGTACACGTG	Sequenzierung von Fibulin-5 in pcDNA3
1288	ROR2-CTERM1 FWD	CAGAGGATCCGCCACCATGCG CAACAAACAGAAGGCTTCGGC CTCCACC	Klonierung von Ror2Cterm in pcDNA3-Vektor
1289	ROR2-CTERM1 REV	CAGATCTAGAGTCGACTTATT TGTCATCATC	Klonierung von Ror2Cterm in pcDNA3-Vektor
522	T7 PCDNA FWD	TAATACGACTCACTATAGGG	Sequenzierung von Ror2Cterm; Sequenzierung der Punktmutanten
1292	ROR2T871A FWD	GCAGCGGCTCCACCAGCGCTG GCTACGTCACCACGGCGCCC	Herstellung der Punktmutante Ror2T871A
1293	ROR2T871A REV	GGGCGCCGTGGTGACGTAGCC AGCGCTGGTGGAGCCGCTGC	Herstellung der Punktmutante Ror2T871A
1294	ROR2Y873A FWD	GCAGCGGCTCCACCAGCACTG GCGCTGTCACCACGGCGCCC	Herstellung der Punktmutante Ror2Y873A
1295	ROR2Y873A REV	GGGCGCCGTGGTGACAGCGCC AGTGCTGGTGGAGCCGCTGC	Herstellung der Punktmutante Ror2Y873A
1296	ROR2T871A/Y873A FWD	GCAGCGGCTCCACCAGCGCTG GCGCTGTCACCACGGCGCCC	Herstellung der Punktmutante Ror2T871A/Y873A
1297	ROR2T871A/Y873A REV	GGGCGCCGTGGTGACAGCGCC AGCGCTGGTGGAGCCGCTGC	Herstellung der Punktmutante Ror2T871A/Y873A
1255	ROR N INT4 FWD	GGCTACTACCAGTGTGTGGC	Sequenzierung der Punktmutanten
1257	ROR N INT5 FWD	GCCGCCAGGAGTACACCATC	Sequenzierung der Punktmutanten
851	PSHUTTLE FWD	GCTAACTAGAGAACCCACTGC	Nachweis von rekombinanten pShuttle- und AV-Vektoren
852	PSHUTTLE REV	CAATGCGATGCAATTTCTCTC	Nachweis von rekombinanten pShuttle- und AV-Vektoren
1254	ROR INT3 REV	CTGACCCTTCATGGGGATGAA C	Nachweis von Ror2 in pShuttle- und AV-Vektoren; Nachweis von Ror2
1080	H-BMP2-F OMP	TATAGAATTCCCAAGCCAAAC ACAAACAGCGG	Nachweis von BMP2 in pShuttle- und AV-Vektoren; Nachweis von BMP2
1081	H-BMP2-R OMP	TATAAAGCTTCTAGCGACACC CACAACCCT	Nachweis von BMP2
664	TAK1 INT3 FWD	CAACTCAGCCACCAGCACAGG	Nachweis von TAK1
668	TAK1 INT4 REV	GACTGCGAGCTGGCTTCTCTG	Nachweis von TAK1
1389	WNT1-1FWD	CTGCCGAGAAACAGCGTTCAT	Nachweis von Wnt-1
1546	WNT 1R2	GTGCAGAAGTTGGGCGATTC	Nachweis von Wnt-1
1387	WNT5A-1FWD	CTGCAGCACAGTGGACAATAC	Nachweis von Wnt-5a
1547	WNT 5R2	CTGTTGACCTGCACCAGCTTG	Nachweis von Wnt-5a

Die eingesetzten Oligonukleotide wurden von der Firma GIBCO BRL synthetisiert.

6.2 Eingesetzte Plasmide

Plasmid	Funktion	Herkunft
pcDNA3	eukaryotischer Expressionsvektor	InvitroGen
pMT7T3f ₁	eukaryotischer Expressionsvektor	Dirks, W. (Eukaryontengenetik, GBF-Braunschweig) (Ahrens et al. 1993)
pGK-βgal-neo	Selektionsplasmid für stabile Transfektionen	Kaps, C. (RDIF, GBF)
pGBKT7	MATCHMAKER Two Hybrid System 3, Binding-domain vector	Clontech
pACT2	MATCHMAKER Two Hybrid System 3, Activating-domain vector	Clontech
pShuttle	adenoviraler Klonierungsvektor	Clontech
pAdeno-X	adenoviraler Expressionsvektor	Clontech

6.3 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Vektor	Verwendeter Klon	Aufbewahrungsort
10T½ pcDNA3		Polyklon	R4/L1/P17-19
BMP2 pcDNA3		Polyklon	R4/L1/P23-25
10T½ ROR2wt/pcDNA3	siehe Mundlos et al.	Polyklon	R4/L1/P26-28
BMP2 ROR2wt/pcDNA3	siehe Mundlos et al.	Polyklon	R4/L1/P20-22
BMP2 RORΔC/pcDNA3	siehe Mundlos et al.	Polyklon	R4/L1/P14-16
AH109 ROR-N/pGBKT7	Variante 2	Klon 5	
AH109 ROR-C/pGBKT7	Variante 3	Klon 2	

6.4 Materialien und Geräte

6.4.1 Geräte

Elektrotransformationsapparat:	Bio-Rad Gene Pulser
Geldokumentation:	PHASE, GelCam
Mikroskope:	Zeiss, IM; Zeiss, Axioplan; Zeiss Axiovert S100; Leitz, Labovet FS;
PCR-Apparatur:	Perkin Elmer, GeneAMP PCR System 9600; ABI, GeneAMP PCR System 2400
Photometer:	Spectronic, Genesys 2; Pharmacia, GeneQuant; Amersham Pharmacia, Ultrospec TM 3100 pro
Sequenzierapparatur:	ABI Prism 310 Genetic Analyzer
Sterilbank:	Heraeus Lamin Air
Zellkulturdokumentation:	INTAS; Sony, Digital Still Camera; Leica, DC200
Zellkulturinkubator:	Heraeus, B 5061 EK/02; Heraeus, BBD 6220; Labotect C200
Zentrifugen:	Heraeus, Megafuge 1.0R; Heraeus, Multifuge 1 S-R; Sorvall, RC5C; Beckmann, TL-100 Ultracentrifuge

6.4.2 Materialien und Zellkulturmedien

Reaktionsgefäße:	Sarstedt-Reaktionsgefäße
Sterilfilter:	Sartorius Membranfilter, Porengröße 0,22 µm; Steritop, Porengröße 0,22 µm
Zellkulturgefäße:	Nunc; TPP; Falcon
FCS:	Gibco
DME:	Sigma
MEM:	Gibco

Die übrigen eingesetzten Geräte und Materialien gehören zur Standard-Laboraausstattung und zeigen keinen relevanten Einfluß auf den Verlauf oder die Dokumentation von durchgeführten Experimenten.

6.4.3 Enzyme und Chemikalien

Die Restriktionsendonukleasen, Alkalische Phosphatase (Shrimp), T4-Ligase, M-MLV-Reverse Transkriptase, Taq-, PfuTurbo- und Herculase Enhanced DNA-Polymerase wurden von den Firmen Biolabs, Boehringer, GIBCO BRL, Pharmacia, Promega, Stratagene und USB bezogen.

Es wurden Chemikalien der Firmen Bayer, Biolabs, Bio-Rad, Boehringer, Fluka, GIBCO BRL, Merck, Pharmacia, Renner, Riedel-de-Haen, Roth, Seromed, Serva und Sigma verwendet.

6.5 Computerprogramme/Datenbanken (Internet)

Adobe Photoshop 5.0	
Corel WordPerfect Suite 8.0	
DNASTAR 4.0	
Microsoft Excel97	
Microsoft Word97	
MVPilot 1.0 Zellkulturdokumentation	
WinCam 1.0	
Reference Manager 9.0	
Blast-search:	www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-blast
Medline:	www4.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/medline.html
Entrez nucleotide query:	www3.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=n&form

6.6 Abkürzungen

l DNA	Lambda-DNA	MEK	Mitogen extracellular signal regulated kinase
μF	Microfarad	MEKK	MEK kinase
μg	Mikrogramm	mg	Milligramm
μl	Mikroliter	min	Minute
μm	Mikrometer	ml	Milliliter
A	Alanin	mM	Millimol
A	Adenosin	Nde I	Restriktionsendonuklease
APS	Ammoniumperoxydisulfat	NF-κB	Nuclear factor-κB
AS	Aminosäuren	ng	Nanogramm
ATP	Adenosintriphosphat	nm	Nanometer
BamH I	Restriktionsendonuklease	nmol	Nanomol
bp	Basenpaare	Not I	Restriktionsendonuklease
C	Cytidin	O.D.	Optische Dichte
c	Konzentration	P	Prolin
c.a.	konstitutiv aktiv	Pac I	Restriktionsendonuklease
cDNA	komplementäre DNA	PAK	p21-activated kinase
ddNTP	Didesoxynukleotridtriphosphat	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
DEPC	Diethylpyrocarbonat	PEG	Polyethylenglycol
d.h.	das heißt	PI-Sce I	Restriktionsendonuklease
DMSO	Dimethylsulfoxid	PFA	Paraformaldehyd
d.n.	dominant negativ	pmol	Picomol
DNA	Desoxyribonukleinsäure	pMT7T3f₁	Expressionsvektor
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat	RNA	Ribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol	RNase	Ribonuklease
E	Glutaminsäure	rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
EcoR I	Restriktionsendonuklease	RT	Raumtemperatur
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion
ERK	Extracellular signal regulated kinase	Sal I	Restriktionsendonuklease
g	Erdbeschleunigung	SDS	Natriumdodecylsulfat
g	Gramm	sec	Sekunde
G	Glycin	Sma I	Restriktionsendonuklease
G	Guanosin	Swa I	Restriktionsendonuklease
h	Stunde	T	Threonin
HEPES	N-2-Hydroxyethylenpiperazin -N-ethansulfonsäure	T	Thymidin
Hind III	Restriktionsendonuklease	T	Tryptophan
His	Histidin	TAK1	TGF-β activated kinase 1
HPK1	Hematopoietic progenitor kinase 1	TAK1ca	konstitutiv aktives TAK1
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase	TAK1dn	dominant negatives TAK1
I-Ceu I	Restriktionsendonuklease	TE	Tris-EDTA
IgG	Immunglobulin G	TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
kb	Kilobasen (1000 Basenpaare)	TGF-β	Transforming growth faktor-β
konz	konzentriert	Trp	Tryptophan
kV	Kilovolt	U	Unit
l	Liter	UV	Ultraviolett
Leu	Leucin	V	Volt
LMP	Low Melt ing Point	v/v	volume per volume
M	Mol	Vol	Volumen
mA	Milliampère	wt	Wildtyp
MAP	Mitogen activated protein	w/v	weight per volume
MAPK	MAP kinase	Xba I	Restriktionsendonuklease
MAPKK	MAPK kinase	X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoyl-β-D-galactopyranosid
MAPKKK	MAPKK kinase	Xho I	Restriktionsendonuklease
MAPKKKK	MAPKKK kinase	Y	Tyrosin
MCS	Multiple cloning site	z.B.	zum Beispiel

6.7 Literatur

- Afzal,AR and Jeffery,S (2003). One gene, two phenotypes: ROR2 mutations in autosomal recessive Robinow syndrome and autosomal dominant brachydactyly type B. *Hum Mutat* 22(1):1-11.
- Afzal,AR, Rajab,A, Fenske,CD, Oldridge,M, Elanko,N, Ternes-Pereira,E *et al.* (2000). Recessive Robinow syndrome, allelic to dominant brachydactyly type B, is caused by mutation of ROR2. *Nat Genet* 25(4):419-422.
- Ahn,NG, Seger,R, Bratlien,RL, Diltz,CD, Tonks,NK, and Krebs,EG (1991). Multiple components in an epidermal growth factor-stimulated protein kinase cascade. In vitro activation of a myelin basic protein/microtubule-associated protein 2 kinase. *J Biol Chem* 266(7):4220-4227.
- Ahrens,M, Ankenbauer,T, Schröder,D, Hollnagel,A, Mayer,H, and Gross,G (1993). Expression of Human Bone Morphogenetic Proteins - 2 or - 4 in Murine Mesenchymal Progenitor C3H10T½ Cells Induces Differentiation into Distinct Mesenchymal Cell Lineages. *DNA Cell Biol* 12:871-880.
- Attisano,L and Wrana,JL (1996). Signal transduction by members of the transforming growth factor-beta superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* 7(4):327-339.
- Avruch,J, Zhang,X, and Kyriakis,JM (1994). Raf meets Ras: Completing the framework of a signal transduction pathway. *Trends Biochem Sci* 19:279-283.
- Birnboim,HC and Doly,J (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1523.
- Burt,DW and Paton,IR (1992). Evolutionary origins of the transforming growth factor-beta gene family. *DNA Cell Biol* 11(7):497-510.
- Canagarajah,BJ, Khokhlatchev,A, Cobb,MH, and Goldsmith,EJ (1997). Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* 90(5):859-869.
- Cano,E and Mahadevan,LC (1995). Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *TIBS* 20:117-122.
- Carlson,CS, Tulli,HM, Jayo,MJ, Loeser,RF, Tracy,RP, Mann,KG *et al.* (1993). Immunolocalization of noncollagenous bone matrix proteins in lumbar vertebrae from intact and surgically menopausal cynomolgus monkeys. *J Bone Miner Res* 8:71-81.
- Celeste,AJ, Ianazzi,JA, Taylor,RC, Hewick,RM, Rosen,V, Wang,EA *et al.* (1990). Identification of transforming growth factor-β family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:9843-9847.
- Chaika,OV, Chaika,N, Volle,DJ, Wilden,PA, Pirruccello,SJ, and Lewis,RE (1997). CSF-1 receptor/insulin receptor chimera permits CSF-1-dependent differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem* 272(18):11968-11974.
- Chang,WP, Ye,Y, and Clevenger,CV (1998). Stoichiometric structure-function analysis of the prolactin receptor signaling domain by receptor chimeras. *Mol Cell Biol* 18(2):896-905.
- Chen,YR, Wang,X, Templeton,D, Davis,RJ, and Tan,TH (1996). The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation. *J Biol Chem* 271(50):31929-31936.
- Childs,SR, Wrana,JL, Arora,K, Attisano,L, O'Connor,MB, and Massague,J (1993). Identification of a *Drosophila* activin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(20):9475-9479.
- Chomczynski,P and Sacchi,N (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162(1):156-159.
- Crews,CM, Alessandrini,A, and Erikson,RL (1992). The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science* 258(5081):478-480.

- De Crombrughe,B, Lefebvre,V, Behringer,RR, Bi,W, Murakami,S, and Huang,W (2000). Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation. *Matrix Biol* 19(5):389-394.
- DeChiara,TM, Kimble,RB, Poueymirou,WT, Rojas,J, Masiakowski,P, Valenzuela,DM *et al.* (2000). Ror2, encoding a receptor-like tyrosine kinase, is required for cartilage and growth plate development. *Nat Genet* 24(3):271-274.
- Deng,C, Wynshaw-Boris,A, Zhou,F, Kuo,A, and Leder,P (1996). Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell* 84:911-921.
- Derijard,B, Hibi,M, Wu,IH, Barrett,T, Su,B, Deng,T *et al.* (1994). JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 76(6):1025-1037.
- Derijard,B, Raingeaud,J, Barrett,T, Wu,IH, Han,J, Ulevitch,RJ *et al.* (1995). Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* 267(5198):682-685.
- Derynck,R and Feng,XH (1997). TGF- β receptor signaling. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 1333(2):F105-F150.
- Doctor,JS, Jackson,PD, Rashka,KE, Visalli,M, and Hoffmann,FM (1992). Sequence, biochemical characterization, and developmental expression of a new member of the TGF- β superfamily in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 151:491-505.
- Ellinger-Ziegelbauer,H, Brown,K, Kelly,K, and Siebenlist,U (1997). Direct activation of the stress-activated protein kinase (SAPK) and extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) pathways by an inducible mitogen-activated protein Kinase/ERK kinase kinase 3 (MEKK) derivative. *J Biol Chem* 272(5):2668-2674.
- Erlebacher,A, Filvaroff,EH, Gitelman,SE, and Derynck,R (1995). Toward a molecular understanding of skeletal development. *Cell* 80:371-378.
- Forrester,WC, Dell,M, Perens,E, and Garriga,G (1999). A *C. elegans* Ror receptor tyrosine kinase regulates cell motility and asymmetric cell division. *Nature* 400(6747):881-885.
- Ganiatsas,S, Kwee,L, Fujiwara,Y, Perkins,A, Ikeda,T, Labow,MA *et al.* (1998). SEK1 deficiency reveals mitogen-activated protein kinase cascade crossregulation and leads to abnormal hepatogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(12):6881-6886.
- Giard,DJ, Aaronson,SA, Todaro,GJ, Arnstein,P, Kersey,JH, Dosik,H *et al.* (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51(5):1417-1423.
- Givol,D and Yayon,A (1992). Complexity of FGF receptors: genetic basis for structural diversity and functional specificity. *FASEB J* 6(15):3362-3369.
- Gruss,P and Walther,C (1992). Pax in development. *Cell* 69(5):719-722.
- Gupta,S, Campbell,D, D erijard,B, and Davis,RJ (1995). Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science* 267:389-393.
- Han,J, Lee,JD, Bibbs,L, and Ulevitch,RJ (1994). A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265(5173):808-811.
- Han,J, Lee,JD, Jiang,Y, Li,Z, Feng,L, and Ulevitch,RJ (1996). Characterization of the structure and function of a novel MAP kinase kinase (MKK6). *J Biol Chem* 271(6):2886-2891.
- Hanafusa,H, Ninomiya-Tsuji,J, Masuyama,N, Nishita,M, Fujisawa,J, Shibuya,H *et al.* (1999). Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in transforming growth factor-beta-induced gene expression. *J Biol Chem* 274(38):27161-27167.
- Hauschka,PV (1986). Osteocalcin: the vitamin K-dependent Ca²⁺-binding protein of bone matrix. *Haemostasis* 16(3-4):258-272.

- Hauschka,PV and Gallop, PM (1977). Purification and calcium-binding properties of osteocalcin, the gamma-carboxyglutamate-containing protein of bone. Wasserman, Calcium binding proteins and calcium function Elsevier/North-Holland, 338-347
- Heersche,JN, Reimers,SM, Wrana,JL, Waye,MM, and Gupta,AK (1992). Changes in expression of alpha 1 type I collagen and osteocalcin mRNA in osteoblasts and odontoblasts at different stages of maturity as shown by in situ hybridization. *Proc Finn Dent Soc* 88 Suppl 1:173-182.
- Helder,MN, Bronckers,AL, and Woltgens,JH (1993). Dissimilar expression patterns for the extracellular matrix proteins osteopontin (OPN) and collagen type I in dental tissues and alveolar bone of the neonatal rat. *Matrix* 13(5):415-425.
- Hemmati-Brivanlou,A and Melton,DA (1992). A truncated activin receptor inhibits mesoderm induction and formation of axial structures in *Xenopus* embryos. *Nature* 359(6396):609-614.
- Hikasa,H, Shibata,M, Hiratani,I, and Taira,M (2002). The *Xenopus* receptor tyrosine kinase Xror2 modulates morphogenetic movements of the axial mesoderm and neuroectoderm via Wnt signaling. *Development* 129(22):5227-5239.
- Ishitani,T, Ninomiya-Tsuji,J, Nagai,S, Nishita,M, Meneghini,M, Barker,N *et al.* (1999). The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF. *Nature* 399(6738):798-802.
- Jeffrey,JJ and Martin,GR (1966). The role of ascorbic acid in the biosynthesis of collagen. *Biochim Biophys Acta* 126:260-280.
- Kani,S, Oishi,I, Yamamoto,H, Yoda,A, Suzuki,H, Nomachi,A *et al.* (2004). The receptor tyrosine kinase Ror2 associates with and is activated by casein kinase Iepsilon. *J Biol Chem*.
- Kingsley,DM (1994a). The TGF- β superfamily: New members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 8:133-146.
- Kingsley,DM (1994b). What do BMPs do in mammals? Clues from the mouse short-ear mutation. *Trends Genet* 10:16-21.
- Kingsley,DM, Bland,AE, Grubber,JM, Marker,PC, Russel,LB, Copeland,NG *et al.* (1992). The mouse short ear skeletal morphogenesis locus is associated with defects in a bone morphogenetic member of the TGF- β superfamily. *Cell* 71:399-410.
- Krumlauf,R (1994). Hox genes in vertebrate development. *Cell* 78(2):191-201.
- Kyriakis,JM, App,H, Zhang,XF, Banerjee,P, Brautigan,DL, Rapp,UR *et al.* (1992). Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* 358(6385):417-421.
- Kyriakis,JM, Banerjee,P, Nikolakaki,E, Dal,T, Ruble,EA, Ahmad,MF *et al.* (1994). The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 369:156-160.
- Lange-Carter,CA, Pleiman,CM, Gardner,AM, Blumer,KJ, and Johnson,GL (1993). A divergence in the MAP kinase regulatory network defined by MEK kinase and Raf. *Science* 260(5106):315-319.
- Lavoie,JN, L'Allemain,G, Brunet,A, Muller,R, and Pouyssegur,J (1996). Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J Biol Chem* 271(34):20608-20616.
- Lee,K, Deeds,JD, Bond,AT, Juppner,H, Abou-Samra,AB, and Segre,GV (1993). In situ localization of PTH/PTHrP receptor mRNA in the bone of fetal and young rats. *Bone* 14(3):341-345.
- Lieber,M, Smith,B, Szakal,A, Nelson-Rees,W, and Todaro,G (1976). A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer* 17(1):62-70.

- Lin,A, Minden,A, Martinetto,H, Claret,FX, Lange-Carter,C, Mercurio,F *et al.* (1995). Identification of a dual specificity kinase that activates the Jun kinases and p38-Mpk2. *Science* 268(5208):286-290.
- Liu,JP, Baker,J, Perkins,AS, Robertson,EJ, and Efstratiadis,A (1993). Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75(1):59-72.
- Lu,Q, Paredes,M, Zhang,J, and Kosik,KS (1998). Basal extracellular signal-regulated kinase activity modulates cell-cell and cell-matrix interactions. *Mol Cell Biol* 18(6):3257-3265.
- Lyons,KM, Graycar,JL, Lee,A, Hashmi,S, Lindquist,PB, Chen,EY *et al.* (1989). Vgr-1, a mammalian gene related to Xenopus Bg-1 is a member of the transforming growth factor β gene superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:4554-4558.
- Manser,E, Chong,C, Zhao,ZS, Leung,T, Michael,G, Hall,C *et al.* (1995). Molecular cloning of a new member of the p21-Cdc42/Rac-activated kinase (PAK) family. *J Biol Chem* 270(42):25070-25078.
- Manser,E, Leung,T, Salihuddin,H, Zhao,ZS, and Lim,L (1994). A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature* 367(6458):40-46.
- Marie,PJ (2003). Fibroblast growth factor signaling controlling osteoblast differentiation. *Gene* 316:23-32.
- Masiakowski,P and Carroll,RD (1992). A novel family of cell surface receptors with tyrosine kinase-like domain. *J Biol Chem* 267(36):26181-26190.
- Massague,J (1990). The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 6:597-641.
- Massague,J and Weis-Garcia,F (1996). Serine/threonine kinase receptors: mediators of transforming growth factor beta family signals. *Cancer Surv* 27:41-64.
- Matsuda,T, Nomi,M, Ikeya,M, Kani,S, Oishi,I, Terashima,T *et al.* (2001). Expression of the receptor tyrosine kinase genes, Ror1 and Ror2, during mouse development. *Mech Dev* 105(1-2):153-156.
- Miller,JR, Hocking,AM, Brown,JD, and Moon,RT (1999). Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca²⁺ pathways. *Oncogene* 18(55):7860-7872.
- Miyazono,K, Ten Dijke,P, Ichijo,H, and Heldin,C-H (1994). Receptors for transforming growth factor- β . *Adv Immunol* 55:181-220.
- Moodie,SA, Willumsen,BM, Weber,MJ, and Wolfman,A (1993). Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. *Science* 260(5114):1658-1661.
- Moriguchi,T, Kuroyanagi,N, Yamaguchi,K, Gotoh,Y, Irie,K, Kano,T *et al.* (1996). A novel kinase cascade mediated by mitogen-activated protein kinase kinase 6 and MKK3. *J Biol Chem* 271(23):13675-13679.
- Moriguchi,T, Toyoshima,F, Masuyama,N, Hanafusa,H, Gotoh,Y, and Nishida,E (1997). A novel SAPK/JNK kinase, MKK7, stimulated by TNFalpha and cellular stresses. *EMBO J* 16(23):7045-7053.
- Mundlos,S and Olsen,BR (1997a). Heritable diseases of the skeleton. Part I: Molecular insights into skeletal development-transcription factors and signaling pathways. *FASEB J* 11(2):125-132.
- Mundlos,S and Olsen,BR (1997b). Heritable diseases of the skeleton. Part II: Molecular insights into skeletal development-matrix components and their homeostasis. *FASEB J* 11(4):227-233.
- Nelson,WJ and Nusse,R (2004). Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 303(5663):1483-1487.
- Ninomiya-Tsuji,J, Kishimoto,K, Hiyama,A, Inoue,J, Cao,Z, and Matsumoto,K (1999). The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* 398(6724):252-256.

- Oishi,I, Sugiyama,S, Liu,ZJ, Yamamura,H, Nishida,Y, and Minami,Y (1997). A novel *Drosophila* receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. Unique structural features and implication in developmental signaling. *J Biol Chem* 272(18):11916-11923.
- Oishi,I, Suzuki,H, Onishi,N, Takada,R, Kani,S, Ohkawara,B *et al.* (2003). The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway. *Genes Cells* 8(7):645-654.
- Oishi,I, Takeuchi,S, Hashimoto,R, Nagabukuro,A, Ueda,T, Liu,ZJ *et al.* (1999). Spatio-temporally regulated expression of receptor tyrosine kinases, mRor1, mRor2, during mouse development: implications in development and function of the nervous system. *Genes Cells* 4(1):41-56.
- Oldridge,M, Fortuna,AM, Maringa,M, Propping,P, Mansour,S, Pollitt,C *et al.* (2000). Dominant mutations in ROR2, encoding an orphan receptor tyrosine kinase, cause brachydactyly type B. *Nat Genet* 24(3):275-278.
- Ornitz,DM (2001). Regulation of chondrocyte growth and differentiation by fibroblast growth factor receptor 3. *Novartis Found Symp* 232:63-76.
- Owen,TA, Aronow,M, Shalhoub,V, Barone,LM, Wilming,L, Tassinari,MS *et al.* (1990). Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro, reciprocal relationships in the expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* 143:420-430.
- Özkaynak,E, Rueger,DC, Drier,EA, Corbett,C, Ridge,RJ, Sampath,TK *et al.* (1990). OP-1 cDNA encodes an osteogenic protein in the TGF- β family. *EMBO J* 9:2085-2093.
- Özkaynak,E, Schnegelsberg,PNJ, Jin,DF, Munro Clifford,G, Warren,FD, Drier,EA *et al.* (1992). Osteogenic protein-2. A new member of the transforming growth factor- β superfamily expressed early in embryogenesis. *J Biol Chem* 267:25220-25227.
- Padgett,RW, St Johnston,RD, and Gelbart,WM (1987). A transcript from a *Drosophila* pattern gene predicts a protein homologous to the transforming growth factor-beta family. *Nature* 325(6099):81-84.
- Pham,CD, Arlinghaus,RB, Zheng,CF, Guan,KL, and Singh,B (1995). Characterization of MEK1 phosphorylation by the v-Mos protein. *Oncogene* 10(8):1683-1688.
- Pombo,CM, Kehrl,JH, Sanchez,I, Katz,P, Avruch,J, Zon,LI *et al.* (1995). Activation of the SAPK pathway by the human STE20 homologue germinal centre kinase. *Nature* 377(6551):750-754.
- Qian,Y, Commene,M, Ninomiya-Tsuji,J, Matsumoto,K, and Li,X (2001). IRAK-mediated translocation of TRAF6 and TAB2 in the interleukin-1-induced activation of NF κ B. *J Biol Chem* 276(45):41661-41667.
- Quarles,LD, Yohay,DA, Lever,LW, Caton,R, and Wenstrup,RJ (1992). Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development. *J Bone Miner Res* 7(6):683-692.
- Raingaud,J, Whitmarsh,AJ, Barrett,T, Derijard,B, and Davis,RJ (1996). *Mol Cell Biol* 16(3):1247-1255.
- Reszka,AA, Seger,R, Diltz,CD, Krebs,EG, and Fischer,EH (1995). Association of mitogen-activated protein kinase with the microtubule cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(19):8881-8885.
- Reznikoff,CA, Bertram,JS, Brankow,DW, and Heidelberger,C (1973a). Quantitative and qualitative studies of chemical transformation of cloned C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of cell division. *Cancer Res* 33(12):3239-3249.
- Reznikoff,CA, Brankow,DW, and Heidelberger,C (1973b). Establishment and characterization of a cloned cell line of C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of division. *Cancer Res* 33:3231-3238.
- Robey,PG (1989). The biochemistry of bone. *Endocrin. Metabol. Clin. North Amer.* 18: 859-902

- Sakurai,H, Miyoshi,H, Toriumi,W, and Sugita,T (1999). Functional interactions of transforming growth factor beta-activated kinase 1 with IkappaB kinases to stimulate NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 274(15):10641-10648.
- Sakurai,H, Shigemori,N, Hasegawa,K, and Sugita,T (1998). TGF-beta-activated kinase 1 stimulates NF-kappa B activation by an NF-kappa B-inducing kinase-independent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 243(2):545-549.
- Saldanha,J, Singh,J, and Mahadevan,D (1998). Identification of a Frizzled-like cysteine rich domain in the extracellular region of developmental receptor tyrosine kinases. *Protein Sci* 7:1632-1635.
- Sanchez,I, Hughes,RT, Mayer,BJ, Yee,K, Woodgett,JR, Avruch,J *et al.* (1994). Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun. *Nature* 372(6508):794-798.
- Schule,R, Umesono,K, Mangelsdorf,DJ, Bolado,J, Pike,JW, and Evans,R (1990). *Jun-Fos* and receptors for vitamins A and D recognize a common response element in the human osteocalcin gene. *Cell* 61:497-504.
- Schwabe,GC, Tinschert,S, Buschow,C, Meinecke,P, Wolff,G, Gillesen-Kaesbach,G *et al.* (2000). Distinct mutations in the receptor tyrosine kinase gene ROR2 cause brachydactyly type B. *Am J Hum Genet* 67(4):822-831.
- Stein,B, Brady,H, Yang,MX, Young,DB, and Barbosa,MS (1996). Cloning and characterization of MEK6, a novel member of the mitogen-activated protein kinase kinase cascade. *J Biol Chem* 271(19):11427-11433.
- Storm,EE, Huynh,TV, Copeland,NG, Jenkins,NA, Kingsley,DM, and Lee,S-J (1994). Limb alterations in *brachypodism* mice due to mutations in a new member of the TGF β -superfamily. *Nature* 368:639-643.
- Takeuchi,S, Takeda,K, Oishi,I, Nomi,M, Ikeya,M, Itoh,K *et al.* (2000). Mouse Ror2 receptor tyrosine kinase is required for the heart development and limb formation. *Genes Cells* 5(1):71-78.
- Taylor,SM and Jones,PA (1979). Multiple new phenotypes induced in 10T $\frac{1}{2}$ and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell* 17:771-779.
- Tournier,C, Whitmarsh,AJ, Cavanagh,J, Barrett,T, and Davis,RJ (1997). Mitogen-activated protein kinase kinase 7 is an activator of the c-Jun NH2-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(14):7337-7342.
- van Bokhoven,H, Celli,J, Kayserili,H, van Beusekom,E, Balci,S, Brussel,W *et al.* (2000). Mutation of the gene encoding the ROR2 tyrosine kinase causes autosomal recessive Robinow syndrome. *Nat Genet* 25:423-426.
- Wallis,GA (1996). Bone growth: Coordinating chondrocyte differentiation. *Curr Biol* 6(12):1577-1580.
- Wang,WF, Zhou,GS, Hu,MCT, Yao,ZB, and Tan,TH (1997). Activation of the hematopoietic progenitor kinase-1 (HPK1)- dependent, stress-activated c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway by transforming growth factor β (TGF- β)-activated kinase (TAK1), a kinase mediator of TGF β signal transduction. *J Biol Chem* 272(36):22771-22775.
- Weis-Garcia,F and Massagué,J (1996). Complementation between kinase-defective and activation- defective TGF- β receptors reveals a novel form of receptor cooperativity essential for signaling. *EMBO J* 15:276-289.
- Wharton,KA, Thomsen,GH, and Gelbart,WM (1991). *Drosophila* 60A gene, another transforming growth factor β family member, is closely related to human bone morphogenetic proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:9214-9218.
- Wilson,C, Goberdhan,DC, and Steller,H (1993). Dror, a potential neurotrophic receptor gene, encodes a *Drosophila* homolog of the vertebrate Ror family of Trk-related receptor tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(15):7109-7113.
- Wozney,JM (1989). Bone morphogenetic proteins. *Prog Growth Factor Res* 1:267-280.
- Wozney,JM and Rosen,V (1998). Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop* 346:26-37.

- Wozney, JM, Rosen, V, Celeste, AJ, Mitsock, LM, Whitters, MJ, Kriz, RW *et al.* (1988). Novel regulators of bone formation, molecular clones and activities. *Science* 242:1528-1534.
- Wrana, JL, Attisano, L, Wieser, R, Ventura, F, and Massagué, J (1994). Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature* 370:341-347.
- Wu, Z, Wu, J, Jacinto, E, and Karin, M (1997). Molecular cloning and characterization of human JNKK2, a novel Jun NH2-terminal kinase-specific kinase. *Mol Cell Biol* 17(12):7407-7416.
- Xia, Z, Dickens, M, Raingeaud, J, Davis, RJ, and Greenberg, ME (1995). Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270(5240):1326-1331.
- Yao, Z, Diener, K, Wang, XS, Zukowski, M, Matsumoto, G, Zhou, G *et al.* (1997). Activation of stress-activated protein kinases/c-Jun N-terminal protein kinases (SAPKs/JNKs) by a novel mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem* 272(51):32378-32383.
- Yoda, A, Oishi, I, and Minami, Y (2003). Expression and function of the Ror-family receptor tyrosine kinases during development: lessons from genetic analyses of nematodes, mice, and humans. *J Recept Signal Transduct Res* 23(1):1-15.
- Zhang, S, Han, J, Sells, MA, Chernoff, J, Knaus, UG, Ulevitch, RJ *et al.* (1995). Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1. *J Biol Chem* 270(41):23934-23936.
- Zheng, CF and Guan, KL (1993). Properties of MEKs, the kinases that phosphorylate and activate the extracellular signal-regulated kinases. *J Biol Chem* 268(32):23933-23939.
- Zhou, G, Bao, ZQ, and Dixon, JE (1995). Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 270(21):12665-12669.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich jene erwähnen und mich bei ihnen bedanken, die an dem Gelingen dieser Doktorarbeit maßgeblich beteiligt waren:

Herrn PD Dr. Gerhard Gross für die Überlassung des Themas, seine konstruktive Kritik, die Diskussionsbereitschaft sowie die Vertretung der Arbeit vor der Naturwissenschaftlichen Fakultät.

Frau Dr. Andrea Hoffmann für die hervorragende Hilfe im Theoretischen wie Praktischen. Sie war ein unermüdlicher Quell guter Ratschläge und Wissens, der mir oft Auswege aus Sackgassen gewiesen und Probleme lösbar gemacht hat. Ohne ihre Unterstützung wäre ich wohl niemals zu einem Ende gekommen.

Frau PD Dr. Susanne Illenberger für die Übernahme des Koreferats und die damit verbundenen Mühen.

Herrn Prof. Dr. Mendel für die Teilnahme an der Promotionskommission und die damit verbundenen Mühen.

Herrn Dr. Stefan Mundlos für die Überlassung von ROR2 und dessen Deletionsmutanten, die Objekte meiner wissenschaftlichen Studien.

Astrid, Barbara, Claudia, Claudia, Daniela, Doris, Heike, Herbert, Hubert, Inge, Josi, Jutta, Karin, Kurt, Lars, Maren, Renate, Sandra, Sarah, Stephanie, Susanne, Thai, Thomas, Uschi, Walli, Werner und Wilhelm für die stetige Hilfsbereitschaft und die nette und humorvolle Arbeitsatmosphäre in der 3. Etage.

Meinen Eltern, die mein Studium überhaupt erst ermöglicht haben und mich in all meinem Tun immer unterstützen.

Meinen Geschwistern und Freunden, daß sie mich und meine Eigenheiten während dieser Zeit und auch sonst immer ertragen haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Andreas Winkel

Geburtsdatum, -ort: 19.03.1976 in Goslar

Eltern: Lüder Winkel, Dipl.-Ing. Sanitär- und Heizungsbau
Monika Winkel, Sekretärin

Geschwister: eine ältere und eine jüngere Schwester

Anschrift: Klappe 1a
38704 Liebenburg

Hobbys: Lesen, Zeichnen, Filme

Schulbesuche:

August 1982 bis Juni 1986 Grundschule Liebenburg

August 1986 bis 30.05.1988 Orientierungsstufe Liebenburg

August 1988 bis 20.05.1996 Gymnasium Salzgitter-Bad

Studium:

11.09.1996 bis 16.09.1998 Biologiestudium an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen mit Abschluss des Vordiploms

30.09.1998 bis Juli 2001 Fortsetzung des Biologiestudiums an der TU Braunschweig bis zum Erhalt des Diploms

Juli 2000 bis Mai 2001 Anfertigung der Diplomarbeit im Rahmen des Biologiestudiums an der GBF (Gesellschaft für Biotechnologische Forschung) in Braunschweig

Seit dem 01.08.2001 arbeite ich im Rahmen meiner Doktorarbeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mBH (GBF) in Braunschweig.

Liebenburg, den 11.12.2004